

⑫ 公表特許公報(A)

平5-504477

⑬ 公表 平成5年(1993)7月15日

⑭ Int. Cl.³
C 12 Q 1/68
C 07 H 21/04

識別記号 庁内整理番号
ZNA A 8114-4B
8931-4B C 12 N 15/00

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

A※

(全 24 頁)

⑮ 発明の名称 特定のヌクレオチド変異の決定のための方法および試薬

⑯ 特 願 平3-503987

⑰ 出 願 平3(1991)2月15日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)8月12日

⑲ 国際出願 PCT/FI91/00046

⑳ 国際公開番号 WO91/13075

㉑ 国際公開日 平3(1991)9月5日

優先権主張 ㉒ 1990年2月16日 ㉓ 米国(US) ㉔ 482,005

㉕ 発明者 セーデルンド、ハンス フィンランド共和国、01940 エスボー、サロンキンチエ 19
㉖ 発明者 シペーネン、アンークリスチー フィンランド共和国、00270 ヘルシンキ、マンネルヘイミンチエ
ネ 138 アー 11
㉗ 出願人 オリオン・ユヒチユメ オサケ フィンランド共和国、02100 エスボー、オリオンチエ 1
ユキチュア
㉘ 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 外2名
㉙ 指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. (a) 検出可能な量の標的核酸ポリマーを、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、該ポリマーに対してハイブリダイズされる場合には、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に検出されるべき第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
 - (b) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェントを用いてプライマーを延長すること；ならびに
 - (c) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか決定すること
- を含んでなる、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている標的核酸ポリマー中の定められた部位での特定のヌクレオチド変異を検出するための方法。

2. (i) 検出可能な量の標的核酸ポリマーを、一本鎖のかたちで、複数のヌクレオチド残基からなる第1の検出段階プライマーであって、該ポリマーに対してハイブリダイズされる場合には、第1の定められた部位と、プライマーの3'末端との間に第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、第1の定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
- (ii) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェントを用いて第1の検出段階プライマーを延長すること；
- (c) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって第1の定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか決定すること
- (d) 段階(c)において形成された延長された第1検出段階プライマーを標的核酸ポリマーから除去すること；ならびに
- (e) 第2の検出段階プライマーであって、固定化されたポリマーに対してハイブリダイズされる場合には、第2の定められた部位と、プライマー3'末端との間に検出されるべき第3または第4のヌクレオチド残基

と同一であるヌクレオチド残基がないように、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーを加えること

を含んでなる、少なくとも第1のヌクレオチド残基が第2の定められた部位で第4のヌクレオチド残基によって置換されている標的核酸ポリマー中の定められた部位での複数の特定のヌクレオチド変異を検出するための方法。

3. (i) 患者に由来する、検出可能な量の遺伝物質を含有するサンプルをえること；
- (ii) その検出可能な量の遺伝物質を、一本鎖のかたちで第1のオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる第1の検出段階プライマーであって、該遺伝物質に対してハイブリダイズされるときには、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、第1の定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
- (iii) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有し

は第2のヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェントを用いてプライマーを延長すること；

(iv) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか、そして点突然変異が起きているかどうか決定すること

という段階を含んでなる、微生物の病原性または治療に対する耐性を変化させる微生物のゲノムにおける定められた部位での、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている点突然変異の存在を検出するための方法。

5. (i) 非突然変異細胞に対する突然変異細胞の比率を維持しながら、細胞手段から検出可能な量の遺伝物質をえること；
- (ii) 検出可能な量の遺伝物質を、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、該遺伝物質に対してハイブリダイズされるときには、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に検出されるべき第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
- (iii) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへの

ている混合物中、ポリメライジングエージェントを用いてプライマーを延長すること；ならびに

(iv) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか、そして患者が関連遺伝病に対する異常を有するかどうか決定すること

という段階を含んでなる、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている患者の遺伝物質中の定められた部位での特定のヌクレオチド変異から結果として生じる患者の遺伝病異常を検出するための方法。

4. (i) 微生物に由来する、検出可能な量の遺伝物質を含有するサンプルをえること；
- (ii) 検出可能な量の遺伝物質を、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、該遺伝物質に対してハイブリダイズされるときには、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に検出されるべき第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、明確に定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
- (iii) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1また

は第2のヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェントを用いてプライマーを延長すること；ならびに

(iv) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか、そして突然変異細胞が存在するかどうか決定すること

という段階を含んでなる、突然変異細胞が細胞集団中に混合されているとき、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている、遺伝物質中定められた部位での点突然変異を有する細胞を検出する方法。

6. さらに、段階(i)の前に標的核酸ポリマーを固体支持体へ固定化するという段階を含む請求項1から5記載の方法。
7. プライマーが、定められた部位に直接に隣接するヌクレオチド残基から標的核酸ポリマーの3'末端方向に延長される、関心あるヌクレオチド配列の領域に相補的である請求項1から5記載の方法。
8. 核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段を含有するヌクレオシドトリホスフェートがデオキシヌクレオシドトリホスフェートである請求項1から5記載の方法。
9. 核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの

- 取り込みを検出するための手段を含有するヌクレオシドトリホスフェートがジデオキシヌクレオシドトリホスフェートである請求項1から5記載の方法。
10. 混合物が、核酸ポリマーへの第2のヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための、第1の手段とは異なる第2の手段を含有する第2のヌクレオシドトリホスフェートを含む請求項1から5記載の方法。
11. 段階(4)の延長された生成物を取り込まれたヌクレオシドトリホスフェートの取り込みの決定の前に溶出させる請求項2記載の方法。
12. 複数の検出段階プライマーおよび変異ヌクレオチド残基を同定する異なった標識を行なったヌクレオシドトリホスフェートを加えることにより単一の段階でヌクレオチド変異を検出する請求項2記載の方法。
13. 検出可能な量の核酸ポリマーを、少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合された第1の付着部分を含有している、産物増幅反応を行なうことにより検出可能な量の標的核酸ポリマーをえる請求項1から5記載の方法。
14. 微生物がHIVである請求項4記載の方法。
15. 点突然変異がAsp61、Lys10およびThr215の中からえられた部位にある請求項14記載の方法。
16. 細胞がリンパ球である請求項5記載の方法。
17. 細胞が白血病細胞である請求項16記載の方法。
18. (i) 標的核酸ポリマーの1部分に相補的でありハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、酵素核酸ポリメリゼーションのためのプライマーおよび第1の付着部分として有効である、オリゴヌクレオチドを含有する少なくとも1つの増幅プライマー；
- (b) 標的核酸ポリマーの3'から変異ヌクレオチドまでの部分に相補的でありハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する少なくとも1つの検出段階プライマー；ならびに任意に
- (c) 固体マトリックス、および第1付着部分を介して増幅プローブのオリゴヌクレオチドを固定化することのできる少なくとも1つの付着部位を含有する少なくとも1つの固体支持体；および
- (d) 核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段を含有する少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェート
- のひとまとめにされた組合せを含有してなる、標的核酸ポリマーにおける特定のヌクレオチド変異を決定するのに用いるためのキット。
19. 検出段階プライマーが
配列5'-GCG CGG ACA TGG AGG ACG TG
を含んでなる、アポリポ蛋白E多型のヌクレオチド変異の同定において用いるための請求項18記載のキット。
20. 検出段階プライマーが
配列5'-ATG CCG ATG ACC TGC AGA AG
を含んでなる、アポリポ蛋白E多型のヌクレオチド変異の同定において用いるための請求項18記載のキット。
21. 検出段階プライマーが
配列5'-GTA CTG CAC CAG GCG GCC GC
を含んでなる、アポリポ蛋白E多型のヌクレオチド変異の同定において用いるための請求項18記載のキット。
22. 検出段階プライマーが
配列5'-GCC CTG GTA CAC TGC CAG GC
を含んでなる、アポリポ蛋白E多型のヌクレオチド変異の同定において用いるための請求項18記載のキット。
23. 検出段階プライマーが
配列5'-CAT GGT GCA CCT GAC TCC TG
を含んでなる、鎌状赤血球貧血を引き起こすヒトβ-グロビン遺伝子のコドン6におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
24. 検出段階プライマーが
配列5'-CAG TAA CGG CAG GCG GCC GC
を含んでなる、鎌状赤血球貧血を引き起こすヒトβ-グロビン遺伝子のコドン6におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
25. 検出段階プライマーが
配列5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CCA
を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
26. 検出段階プライマーが
配列5'-AGG CAC TCT TGC CTA CGG CAC
を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
27. 検出段階プライマーが
配列5'-AAC TTG TGG TAG TTG GAG CT
を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
28. 検出段階プライマーが
配列5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG
を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
29. 検出段階プライマーが
配列5'-ACT GGT GGT GGT TGG AGC AG
を含んでなる、N-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項18記載のキット。
30. 検出段階プライマーが
配列5'-ATC TGT TGA GGT GGG GAC TT
を含んでなる、HIV-1ウイルスにおけるA2Tに対する耐性の検出において用いるための請求項18記載のキット。
31. 検出段階プライマーが
配列5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT
を含んでなる、囊胞性線維症の検出において用いるための請求項18記載のキット。
32. 酵素触媒作用による連鎖延長核酸ポリメリゼーション反応のためのプライマーとして働くのに十分な長さのオリゴヌクレオチドであって、関心のある遺伝子の領域に相補的な配列を有し、定められた部位から遺伝

子の3'末端方向に直接に隣接するヌクレオチド残基で始まり、定められた部位から遺伝子の3'末端方向に伸びており、それによって、酵素触媒作用による連鎖延長核酸ポリメライゼーションは正常な核酸残基または異常な核酸残基のいずれかに相補的な核酸残基を加えることによって始まるオリゴヌクレオチドプライマーを含んでなる、関心ある遺伝子中の定められた部位で正常な核酸残基が異常な核酸残基で置換される点突然変異の存在を検出するための試薬。

13. オリゴヌクレオチドが10〜40ヌクレオチド残基の長さを有する請求項12記載の試薬。
14. 配列5'-GGG CGG ACA TGG AGG ACG TGを有する請求項32記載の試薬。
15. 配列5'-ATG CCG ATG ACC TGC AGA AGを有する請求項32記載の試薬。
16. 配列5'-GTA CTG CAC CAG GCG GCC GCを有する請求項32記載の試薬。
17. 配列5'-GGC CTG GTA CAC TGC CAG GCを有する請求項32記載の試薬。
18. 配列5'-CAT GGT GCA CCT GAC TGG TGを有する請求項32記載の試薬。
19. 配列5'-CAG TAA CGG CAG GCG GCC GCを有する請求項32記載の試薬。
20. 配列5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CCAを有する請求項32記載の試薬。
21. 配列5'-AGG CAC TCT TGC CTA GCG CACを有する請求項32記載の試薬。
22. 配列5'-AAC TTG TGG TAG TTG GAG CTを有する請求

項32記載の試薬。

23. 配列5'-ACT GGT GGT GGT TGG AGC AGを有する請求項32記載の試薬。
24. 配列5'-ATC TGT TGA GGT GGG GAC TTを有する請求項32記載の試薬。
25. 配列5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CATを有する請求項32記載の試薬。

日付 糸田 三郎

特定のヌクレオチド変異の決定のための方法および試薬

技術分野

本発明は、限定されたポリヌクレオチド領域における特定のヌクレオチド変異の決定のための方法および試薬ならびに特定の点突然変異および遺伝的変異の同定におけるこの方法の用途に関する。

背景技術

生物の遺伝情報は、生物のゲノムのヌクレオチド配列中に伝えられている。遺伝子発現の過程において、ヌクレオチド配列はアミノ酸配列、すなわちタンパク質に翻訳される。ヌクレオチド配列における小さな変化は、一個の塩基の置換でさえ、タンパク質生産物が変更されるという結果を生じうる。えられるタンパク質の質または量が変更されることで、その生物またはその細胞の遺伝表現型（すなわち観察しうる特性）が変化する。そのような遺伝表現型の変化は、たとえば、病気の発展として観察されうる。

遺伝病および癌の素質ばかりでなく、遺伝病の原因となる正確な分子の欠陥についての情報は急速に増加しつつある。しかしながら、多数のサンプルをスクリーニングするための迅速で確かなアッセイ手順がないために、

悪性腫瘍における体細胞変異の関連性についての情報は限られている。

点突然変異によって起こる遺伝病には、鎌状赤血球貧血およびβ-サラセミアが含まれる。これらは、β-グロビン遺伝子における突然変異によって起こる（アントナラキス (Antonarakis)、1989、ニューイングランドジャーナル オブ メディシン (New England J Med)、320巻、153〜163頁）。これらの突然変異は、一般に正常な遺伝子の配列から1から4個のヌクレオチドの置き換え、挿入または削除を包含する。鎌状赤血球貧血は、β-グロビン遺伝子の6番目のコドンにおける唯一の塩基対の置換についてのホモ接合性 (homozygosity) によって起こる（アントナラキス、前出）。β-サラセミアに導きうる、β-グロビン遺伝子における多数の突然変異はすでに特徴づけされている（アントナラキス、前出）。

点突然変異によって起こる、他の知られた遺伝病には、α-サラセミア、フェニルケトン尿症、ヘモフィリア、α₁-アンチトリプシン欠損症（アントナラキス、前出）および囊胞性線維症が含まれる。

囊胞性線維症は、最もありふれた常染色体劣性遺伝病である。白色人種人口の約1/2000人がこの病気にかかっている。したがって、保因者の頻度は約5%である。最近の囊胞性線維症膜貫通型調節物質 (CFTR) 遺伝子（ケレム (Kerem) ら、1989、サイエンス (Science)、245巻、1073-1080頁）のクローニングおよび遺伝学的分析により、ΔF508と表わされる1つの主要な突然変異が判明した。これは、アミノ酸残基508番でフェニルアラニンの欠失を生じる3つのヌクレオチドの削除であ

る。この突然変異の罹患率は、100以上のCF染色体を包含する報告において10~11%の範囲であり、北米およびヨーロッパの患者人口において平均して11%である。囊性繊維症の頻度は高いため、危険群の国 (risk free countries) では保因者のスクリーニングのための、および出生前診断のための有効な方法が必要とされている。

病気に対する素質と関係のある多型性 (polymorphism) の一例は、アポリポタンパク質E遺伝子の3対立 (three-allelic) 多型性である。この多型性は、ApoE遺伝子上の2つのDNA位置での単一塩基置換によるものである (マーレイ (Mallory), 1988, サイエンス, 240 巻, 622 ~ 630 頁)。血清コレステロール水準における個人差の10%ほどは説明しうる。タイプIII 高リポタンパク質血症の患者の90%以上はApoEの対立遺伝子の1つについてホモ接合である。

ヒト主要組織適合性複合体は、ゲノムの保存領域中に位置する連結した遺伝子の多型性システムである。HLA-D (ヒト白血球抗原) 領域中のクラスII遺伝子は一連の高多型性対立遺伝子をコードする (トムソン (Thomson), 1988, アニエアル レビュー オブ ジェネティクス (Annu. Rev. Genet.), 22: 31~50; モレル (Morel) ら, 1988, プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 85: 8111-8115; シャルフ (Scharf) ら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 3304~3308)。この多型性は、インシュリン依存性糖尿病および尋常性天疱瘡な

どの自己免疫疾患に対する罹病性に関連していることが示されている。

ヒト r a s 遺伝子ファミリー (相同なH-, K-およびN-r a s 遺伝子を含む) は、ヒト腫瘍発生において1つの役割を果たす、突然変異変化の潜在的1つである。r a s 遺伝子のコドン12、13または61のいずれにおける点突然変異も、これらの遺伝子を形質転換オンコジーンに変えることがわかっている (ボス (Bos) ら, 1983, ネイチャー (Nature), 313 巻, 710 ~ 713 頁)。N-r a s 遺伝子における体細胞点突然変異が急性骨髄性白血病 (AML) (ファル (Farrel) ら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 1629~1633) および他の血液の悪性腫瘍 (ネリ (Neri) ら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9263-9272) に関連して検出された。非常に多数の正常細胞の中の少量の白血病細胞におけるN-r a s 突然変異の感度のよい検出のための方法は、AMLおよび他のN-r a s 関連悪性腫瘍の治療の追跡調査において、非常に価値ある手段を構成するであろう。

N-r a s 遺伝子のコドン12、13および61の第1および第2の位置における特定の塩基の変更の検出には、多数の異なるオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションまたは増幅されたDNAの直接配列決定のいずれかが必要である。両方法における重大な点は、突然変異を含む細胞の割合である。選別方法によって、検出可能であるためには、突然変異は、分析される細胞の5~20%に存在しなくてはならない。

微生物における点突然変異および遺伝的変異は、病原性または治療に対する耐性の変更につながりうる。ヒト

免疫不全ウイルス (HIV-1) はジドブジン (zidovudine (AZT)) に耐性である変異体をつくり出すことができる。その耐性ウイルス単離体は数個の点突然変異を含むが、3つの突然変異はすべての耐性株に共通するように見える: Asp67-Asn (GAC-AAC)、Lys70-Arg (AAT-GAT) およびThr213-Phe (ACC-TTC) もしくはTyr (ACC-TAC) (ラーダー (Larder) およびケンブ (Kemp), 1989, サイエンス 246: 1135~1138)。

したがって、生物のゲノムにおけるヌクレオチド配列中の変更を正確に、かつ多数のサンプルをスクリーニングしうるほど効率的で簡単に決定することができれば、有意義である。これによって、遺伝的疾患あるいは遺伝病の出生前もしくは後の診断のための機会ならびに癌における体細胞突然変異の検出のための機会がえられる。そのような方法は、産業バイオテクノロジーのための細胞および株の選択に、ならびに植物および動物の改良にも用いられる。現在利用可能な方法は、ルーチンでの使用に限られるという欠点を有している。

DNA配列における多型性または突然変異は、最も一般的には、対立遺伝子特異性オリゴヌクレオチド (ASO) プローブへのハイブリダイゼーションによって検出される。ASOプローブのヌクレオチド配列は、完全にマッチしたハイブリッドを形成するようにまたは変異ヌクレオチド残基の部位にミスマッチした塩基対を含有するように設計される。マッチしたハイブリッドとミスマッチしたハイブリッドとの間の区別は、i) ハイブリダイゼーションまたは洗浄の際に用いられる条件におけるハイブリッドの熱安定性の相異 (ヨーロッパ特許公開 EP-

337362)、ii) 変性勾配電気泳動 (denaturing gradient electrophoresis) により分析されたハイブリッドの安定性の相異またはiii) ミスマッチの部位での化学的開裂 (ヨーロッパ特許公開 EP-332435) に基づく。

変異ヌクレオチドの部位に相補的な3'末端を有するオリゴヌクレオチドが、対立遺伝子特異的プライマーとして用いられている (ヨーロッパ特許公開 EP-332435)。変異ヌクレオチドの同定は、3'末端のミスマッチはポリメライゼーション反応を阻害するという事実にもとづく。オリゴマーリゲーションアッセイにおいて同様の方法が用いられる。その方法では、2つの隣接するオリゴヌクレオチドが、その末端で完全にマッチするときのみ、それらのオリゴヌクレオチドはリゲーションされる (ヨーロッパ特許公開 EP-336731)。

制限酵素でのDNA配列の開裂は、変異ヌクレオチドが、特定の制限部位を、たとえばつくるまたは壊すなど、変更するという条件に、変異の同定に用いられる。ヌクレオチド配列決定は、変異ヌクレオチドの決定のために最も有益な方法である。

上で述べた方法は比較的複雑な手順であり、そのためルーチンの診断における使用が困難であるという欠点を有する。対立遺伝子特異性オリゴヌクレオチドプローブの使用には、それぞれの適用について別々に反応条件を注意深く最適にすることが必要とされる。上の方法のいくつかには、ゲル電気泳動による分画が必要である。そのような方法は、容易に自動化されない。

我々は、今やヌクレオチド変異の検出を可能にする改善された方法を開発した。この方法は、従来の技術に勝るいくつかの利点を提供する。本発明の方法は、少ない、容易に行なわれる手順からなるものである。本発明の方法は、とくに、点突然変異ならびに単一のミスマッチ、欠失、挿入および逆位のようなヌクレオチド変異のルーチンの決定に適している。本発明の方法では、分析される細胞の全数の0.1%程度の少数しか存在しない突然変異の同定だけでなく、サンプル中の突然変異細胞の割合の定量をも可能とする。さらに、開示された方法の全部のプロトコールは、容易に自動化されうる。自動化は、ルーチンの診断においてますます重要になっている。

変異ヌクレオチドの検出の方法は、プライマーの延長および、検出の段階で検出可能なヌクレオチドトリホスフェートの取り込みに基づいている。変異ヌクレオチドと直接に隣接する領域から検出段階プライマーを選択することにより、この変異を1つのヌクレオチドトリホスフェートほどの少ない取り込みの後でも検出することができる。

変異ヌクレオチドとマッチする標識されたヌクレオチドトリホスフェートを加えて、検出段階プライマーへの標識の取り込みを測定する。

検出段階プライマーの選択は本発明の方法にとって重要であり、関心のあるヌクレオチド配列によって決まる。好ましくは検出するべき変異ヌクレオチドから3'末端方向の領域に直接及ぶように検出段階プライマーを選ぶ。検出段階プライマーは、変異ヌクレオチドから取り除かれたいくつかのヌクレオチドの始めの配列に相補的であ

ってもよい。検出段階プライマーの位置に関する唯一の制限は、検出段階プライマーの3'末端と検出すべき変異ヌクレオチドとの間の配列は、検出すべきヌクレオチド残基と同型のものを含んでいてはならないということである。検出段階プライマーは、関心のあるヌクレオチド配列のコードストランドまたは非コードストランドのいずれに対しても、相補的であるように等しくうまく選ぶことができる。

標的核酸は、好ましくは、ヒトゲノム中の単一の変異ヌクレオチドを検出しようとしてインビトロでの増幅により豊富化される。本発明では、これよりも以前に開示された、検出すべき標的核酸の増幅および親和性修飾のための方法を有利に用いることができる。本方法では、変異ヌクレオチドを含有する標的核酸は、標的核酸から増幅混合物を除くことが可能であるような固体支持体上に固定化される。

本発明には、本発明の方法を実施するための個々のプライマー試薬および試薬の組合わせ、すなわちキットもまた含まれる。厳密な試薬および包装は検出するべきヌクレオチド変異または点突然変異のタイプによるが、そのようなキットには一般に、少なくとも1つの付着部分を有する修飾された増幅プライマーおよび少なくとも1つの検出段階プライマーが含まれるが、また、標的核酸の修飾されたコピーを固定化するのに適合する少なくとも1つの支持体および少なくとも1つの標識化ヌクレオシドトリホスフェートを含んでいてもよい。

図面の簡単な説明

FIG 1は、1つの変異ヌクレオチド残基(X_1 または X_2)が検出されるばあいの、開示された方法による試験のための構成を説明するものである。

FIG 2は、検出段階プライマーが検出すべき変異ヌクレオチドからnヌクレオチドのヌクレオチド配列に及ぶように選ばれたものであるばあいの、開示された方法による試験のための構成を説明するものである。

FIG 3は、互いに隣接する複数のミスマッチを検出するばあいの、開示された方法による試験のための構成を説明するものである。このばあいには、試験は2段階で行なわれる。段階2を行なう前に、検出段階プライマー1を溶出させる。

図面で用いる記号：

- X および X' はヌクレオチド残基を示す。
- 検出すべき変異ヌクレオチドは、 X_1 、 X_2 、 X_3 または X_4 のいずれかで示される。
- Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 はそれぞれ X_1 、 X_2 、 X_3 または X_4 に相補的なヌクレオチドを示す。
- dY はデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートを示す。
- dY^* および dY^+ は標識化デオキシリボヌクレオシドトリホスフェートを示す。
- ddY はジデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートを示す。
- ddY^* および ddY^+ は標識化ジデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートを示す。
- $*$ および $+$ は異なる検出可能な標識を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、複雑な核酸混合物中に存在する核酸のあらかじめ定められた領域における特定のヌクレオチド変異を決定する方法に属する。ヌクレオチド変異を含むこの定められた領域を、ここでは「標的核酸」と呼ぶ。

本発明の方法は、検出すべき変異ヌクレオチドから3'のヌクレオチド配列に相補的な少なくとも1つの検出段階プライマーを用いるプライマー延長反応に基づいている。変異ヌクレオチドの検出は、検出段階プライマーの延長により取り込まれる標識化ヌクレオシドトリホスフェートを検出することにより行なわれる。

好ましくは、検出段階に先立って、検出可能な量の標的核酸をえるため標的核酸をインビトロで増幅する。核酸の現実の量は、検出段階で用いる標識部分およびその標識部分を分析する技術の感度により異なるであろう。本発明の好ましい方法においては、標的核酸の関心のある領域のコピー中に親和性部分を導入する。少なくとも1つの親和性標識をされた増幅プライマーを用いたプライマー依存増幅反応により、親和性部分の導入を便利に行なう。標的核酸のコピーを、導入した親和性部分の助けで固体支持体上に固定化する。

テストの異なる構成を以下に好ましい具体例の記載において述べ、さらに実施例により説明する。テストの作成の可能性はこれらの示された実施例に限定されるものでないことおよびテストの構成は与えられた検出すべき突然変異またはヌクレオチド変異によって決定されるということは、当業者にとって明白である。

a) 標的DNAのコピーへの親和性部分の導入

変異ヌクレオチド残基を含むと思われる標的核酸源 (DNAまたはRNA) は、ヒト、動物もしくは植物の細胞または微生物のいずれでもよい。標的核酸は、通常の核酸精製方法により、生物学的サンプルから単離することができるが、本発明の方法では、精製していない生物学的サンプルを用いることが可能である。

関心のある変異ヌクレオチド部位を含む標的核酸を、好ましくは関心のあるヌクレオチド配列に近接した1またはそれ以上のプライマーを用いてインビトロで増幅する。ここで用いられる「増幅」の語は、ポリメライジングエージェントの助けをかりたヌクレオチド配列のいかなるプライマー依存延長をも指す。適当なプライマー依存延長反応は、たとえばポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) (クレッペ (Kleppel) ら、1971、ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー (J. Mol. Biol.) 56: 341 ~ 361 およびアメリカ特許 4, 633, 202)、プライマー依存複製および非依存転写の両方を用いる方法 (ヨーロッパ特許公開 EP-329822) またはリゲーション増幅反応法 (ligation amplification reaction) (PCT特許公開 WO-89/09833) である。

我々はこれより前に、ルーチン診断手段として用いるのに向いている簡便なヌクレオチド配列決定法を開発した (アメリカ特許出願 S. N. 277, 843、ここでは参考として組み入れる)。この方法は、ここで参考として組み入れるアメリカ特許 S. N. 024, 604 に開示された親和性を基礎とするハイブリッド収束法を利用する。好ましくは、

ここで用いられる「付着部分」の語は、他の構成要素に対して親和性を有し、その構成要素とともに親和性ペアを形成するいずれの構成要素をも指す。たとえば、ビオチン-アビジン/ストレプトアビジン、抗原もしくはハプテン-抗体、重金属誘導体-チオ基、ポリ d G-ポリ d C、ポリ d A-ポリ d T およびポリ d A-ポリ U のようなホモポリヌクレオチドなどの様々なポリヌクレオチドがそのような親和性ペアである。互いに強い親和性を有するいかなる構成要素ペアをも、親和性ペアとして用いることができる。免疫学的方法において用いられるリガンドおよびコンジュゲートの中にも適当な親和性ペアを見出す。「付着部分」は親和性部分または親和性部分の付着のための部位を提供する部分である。

ここで用いられる「修飾された増幅プライマー」の語は、付着部分を含むように修飾されたオリゴヌクレオチドプライマーを指す。オリゴヌクレオチドプライマーは、標準的な化学的方法によって合成してもよいし、組換え DNA 技術により作製してもよい。増幅プライマーの必須の特徴は、関心のある部位が増幅されるように、配列中のある点で元の関心のある標的ヌクレオチド配列と塩基対形成によって特異的に結合することができるということである。したがって、増幅は標的核酸の 3' 末端と関心のある部位との間の標的ヌクレオチド配列の領域に相補的でなくてはならない。増幅プライマーの 3' 末端は、ポリメラーゼ酵素の前進性における限界のため、好ましくは関心のある部位から 100 残基以上離れていない点にある標的核酸配列と相補的である。プライマーの大きさは、好ましくは 14 から 40 塩基の間であるが、8 塩基

テストすべき標的 DNA を、配列決定の前にインビトロで増幅する。この方法では、増幅反応に用いるプライマーの 1 つは、ビオチンのような付着部分を含む。豊富化された断片を、ストレプトアビジンまたはアビジンを付着した固体マトリックス上に捕獲する。過剰の試薬を、マトリックスを洗浄することにより完全に除去する。捕獲された断片を一本鎖とし、錠終わり反応を直接マトリックス上で行なう。錠終わり反応の生成物を解放し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動ののちヌクレオチド配列を決定する。この診断に適した固相配列決定法には、前記のヌクレオチド変異の決定のための従来の技術よりも有利な点がいくつかあるが、しかし依然として手のかかる、高価な、熟練を要する配列決定ゲル電気泳動段階が含まれる。

本発明では、ヌクレオチド変異を含むと思われる標的核酸の増幅は、標的核酸配列のコピー中に親和性部分を導入した修飾プライマーを用いることにより簡便に行なわれる。そのような増幅においては、一方または両方の増幅プライマーを付着部分を含むように修飾する。どちらの増幅プライマーを修飾するように選択するかによって、二重鎖 DNA のどちらの鎖上に変異部位が検出されるか決定することが可能である。好ましくは、この修飾ポリメラーゼ連鎖反応を適当なサイクル数行なうことで、関心のある標的配列を増幅する。

この過程の結果として、合成されたポリヌクレオチド分子中へ修飾プライマーを取り込むことにより、元の標的核酸配列のコピー、今や付着部分で修飾されているコピーをえる。

ほどの短いプライマーまたは 10 塩基よりかなり長いプライマーも用いうる。化学的または酵素的または他の方法を用いて、プライマーを付着部分にて修飾する。好ましくは、付着部分はプライマーの 5' 末端に付着させる。プライマーの塩基対を形成する性質および延長反応において機能する能力を維持するという条件で、他の部位に付着することもまた可能である。

b) 標的核酸コピーの分離

増幅のあと、標的核酸コピーを増幅混合物から分離する。本発明の好ましい方法においては、付着部分を含む標的核酸分子のコピーを、相補的付着部位、たとえば親和性ペアの他方の構成要素の助けで固体マトリックス上に固定化する。つぎに、マトリックスを洗浄して、検出段階の間の反応を妨げる、ヌクレオチドトリホスフェートおよびプライマーのようなすべての非結合物質を除去する。固定化された標的核酸を、固定化段階の前または後のいずれかに一本鎖にする。修飾された標的核酸コピーの固定化により、同じ関心のある標的配列について複数の決定を行わなくてはならないとき、標的配列を再使用することが可能となる。

ここで用いられる「固体マトリックス」の語は、ビーズ、微粒子、マイクロタイターウェルもしくは試験管の表面、吸液綿 (dipstick) またはフィルターのよう、いかなるかたちをも指す。マトリックスの材料は、ポリスチレン、セルロース、ラテックス、ニトロセルロース、ナイロン、ポリアクリルアミド、デキストランまたはアガロースであってもよい。材料について唯一の必要条件は、付着部位がそれに付着することができるということ

である。

c) 検出段階プライマー

増幅混合物から分離したのち、一本鎖DNA断片をプライマー、すなわち変異ヌクレオチドの3'ヌクレオチド配列と相補的である検出段階プライマーとハイブリダイズさせる。これは固定化された状態で、または溶液中で行なうことができる。

ここで用いる「検出段階プライマー」の語は、プライマー依存延長のための開始点として機能するオリゴまたはポリヌクレオチドプライマーをさす。検出段階プライマーは、検出すべき変異ヌクレオチドと直接または近接して隣接するヌクレオチド配列とハイブリダイズするように選ばれる。前記の段階(i)においてどちらのストランドが固定化されたかによって、二重鎖の標的のコードストランドまたは非コードストランドのいずれに対して相補的であるようにも検出段階プライマーを選ぶことができる。たとえば前記a)項で述べたように親和性部分で、しかし異なる親和性部分を用いて検出段階プライマーを修飾することができる。好ましくは、検出段階プライマーは修飾しない。

検出段階プライマーの選択は、検出すべきヌクレオチド変異の性質によって決められる。

本発明の方法の好ましい具体例では、検出段階プライマーを、検出すべき変異ヌクレオチドに直接隣接しているように選ぶ。

本発明の方法の別の具体例では、検出段階プライマーを、検出すべき変異ヌクレオチドからnヌクレオチド残基離れたヌクレオチド配列にハイブリダイズしうよう

も、親和性マトリックスを洗浄したのち、取り込まれた標識を直接にマトリックス上でまたは溶出後に測定する。

ここで用いる「標識化ヌクレオシドトリホスフェート」の語は、検出可能な標識で標識された、または検出可能な標識と結合可能な付着部分を包含するよう修飾されたいかなるヌクレオシドホスフェート、デオキシもしくはジデオキシヌクレオシドトリホスフェートをも指す。感度は、標識の検出されやすさにより変化するが、本発明の方法は、用いられる標識に依存しない。検出可能な標識の選択に関する唯一の制限は、ポリメリゼーション反応の間、標識化ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを妨害しないということである。

ここで用いる「ポリメライジングエージェント」の語は、核酸のプライマー依存延長の可能ないかなる酵素をも指す。適当な酵素には、たとえば、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、エシェリシア コリ (*Escherichia coli*) DNAポリメラーゼのクレナウ (Klenow) 断片および他の適当なDNAポリメラーゼ、逆転写酵素ならびにサーマス アクアチカス (*Theracus aquaticus*) およびサーマス サモフィラス (*Thermophilus*) のような高温細菌由来のポリメラーゼが含まれる。

e) ヌクレオチド変異を検出する好ましい態様

FIG 1は本発明の具体例を図式で説明するものである。調べるべき部位の2つの二者択一のヌクレオチド残基を表わす X_1 および X_2 とともに、標的核酸を X' で表わす。FIG 1で説明される検出段階プライマーは Y' で表わされ、調べるべき部位の3'の文字で直接始まる標的

に選択する。検出段階プライマーの3'末端と変異ヌクレオチドとの間のn個のヌクレオチド残基に関する唯一の制限は、これらnヌクレオチド残基の中に検出すべき残基と同一のヌクレオチド残基があってはならないということである。

本発明の別の具体例では、2またはそれ以上の変異ヌクレオチド残基を同定する。このばあいには、少なくとも2つの異なる検出段階プライマーを設計することが必要である。

検出すべきヌクレオチド変異によるテストの構成を、さらに以下に述べる。

d) 検出段階プライマーの延長

検出段階プライマーを標的核酸のコピーとアニーリングさせ、プライマー延長に適する条件の下、少なくとも1つの標識されたもしくは修飾されたヌクレオシドトリホスフェートを含む1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有する溶液に、ポリメライジングエージェントとともに加える。標識化デオキシリボヌクレオシドトリホスフェート(dNTPs)または既終わりジデオキシリボヌクレオシドトリホスフェート(ddNTPs)のいずれをも用いることができる。ポリメライジングエージェントにより、プライマーは、プライマーと隣接する変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオシドトリホスフェートで延長される。この検出段階プライマー延長の間、延長された核酸を、たとえば修飾され増幅されたコピーの親和性結合によって、固定化していてもよい。または、そののち、たとえば親和性-修飾化検出子プライマーによって、固定化していてもよい。いずれのばあいに

配列の部分に相補的である。本発明を実行するには、検出段階プライマーを標的配列にハイブリダイズし、選ばれた1種のヌクレオシドトリホスフェートまたは複数種ヌクレオシドトリホスフェートの混合物を加え、プライマーの延長に好ましい条件下、鎖延長反応を進めさせる。

本発明の最も単純な具体例では、ヌクレオシドトリホスフェート混合物には、 X_1 または X_2 のいずれかに対応する、標識化ジデオキシヌクレオシドトリホスフェート(ddNTP)のみが含まれる(FIG 1の選択枝a)。ddNTPの取り込み、この1つのヌクレオチドのみの取り込みによりプライマーの延長が終了し、その後、加えたヌクレオチドの取り込まれた標識を検出することにより、変異ヌクレオチドを決定することができる。

この具体例は、検出すべきヌクレオチド変異が単一の点突然変異($X_1 \rightarrow X_2$)からなるものであるときに、とくに適している。サンプルを2つの部分に分割することができる。そののち、サンプルの1つから X_1 を検出し、他方から X_2 を検出する。これにより、ヘテロ接合のサンプルを同定することができる。分割しないサンプルに、2またはそれ以上の異なる、かつ異なる標識をされたddNTPを加えることも、同じく可能である

(FIG 1の選択枝b)。この具体例では、1つの分割しないサンプルから、同部位に生じた1以上の点突然変異を決定することが可能である($X_1 \rightarrow X_2$, X_3 または X_4)。

検出すべき変異ヌクレオチドに対応する標識化デオキシヌクレオシドトリホスフェート(dNTP)を用いて、この標識の取り込みを測定することも可能である。標識

化 d N T P を用いるときは、他の 3 種のヌクレオチド残基に対応する非標識化 d d N T P を加えることが、必要ではないが有利である (FIG 1 の選択枝 C)。読終わり d d N T P を加えることで、おそらく修飾段階 (i) から残る N T P の取り込みを防ぐ手段が提供される。

さらに別の可能性は、2 またはそれ以上の異なる、かつ異なる標識をされた d N T P を用いることにより、分割しないサンプル中のヘテロ接合体を検出することが可能となることである。2 以上の標識化 d N T P を用いるばあい、標的配列中の変異ヌクレオチド残基の後のヌクレオチド残基 X が加えたヌクレオチドのいずれかと同一であると、結果の解釈が困難であるかもしれない (図 1 の選択枝 d)。

FIG 2 は、本発明の他の具体例を図式で説明するものである。FIG 2 における検出段階プライマーは、検出すべき変異ヌクレオチドから n ヌクレオチド残基離れて始まっている標的配列の部分と相補的である。検出段階プライマーの 3' 末端と変異ヌクレオチドとの間の n 個のヌクレオチド残基に関する唯一の制限は、これら n ヌクレオチド残基の中に検出すべきものと同一のヌクレオチド残基があってはならないことである。このばあい、加えるヌクレオシドトリホスフェートは、プライマーと変異ヌクレオチドとの間の n ヌクレオチドに相補的な非標識化 d N T P および少なくとも 1 つの検出すべきヌクレオチド変異によって決まる標識化ヌクレオシドトリホスフェートからなる。もちろん、前に述べたように、FIG 1 b および d で説明される具体例において、2 またはそれ以上の異なる標識をされた d d N T P を用いることが

できる。

さらに、FIG 3 は本発明の 2 またはそれ以上の変異ヌクレオチド残基を同定する、また別の具体例を図式で説明するものである。このばあいには、少なくとも 2 つの異なる検出段階プライマーを設計することが必要である。第 1 のプライマーは、第 1 の変異ヌクレオチド残基に直接に隣接して始まるヌクレオチド配列に相補的であるように選ばれる (FIG 3 のプライマー 1)。さらに、プライマー 1 により検出される第 1 の変異ヌクレオチド残基にも及ぶように 1 またはそれ以上の検出プライマーを選ぶ。テストは、サンプルを 2 つに分割して行なうことができる。それによって、プライマー 1 をサンプル 1 に加え、第 1 の変異ヌクレオチド残基を同定する。他の 2 つのプライマー (FIG 3 のプライマー 2 および 3) をサンプル 2 に加え、第 2 の変異ヌクレオチドを検出する。標的核酸配列の固定化によって、第 1 の変異ヌクレオチドの検出ののちの、プライマーを除去するための溶出段階を含めて、前述の検出段階を続けて行なうことによりその後の 2 またはそれ以上の変異ヌクレオチドを分割しない単一のサンプルから同定することができる。

本発明の方法を実行するのに用いる試薬は、別々に提供されてもよく、またはキットの形態にひとまとめにされていてもよい。たとえば、1 またはそれ以上の検出段階プライマーおよび 1 またはそれ以上の標識化ヌクレオチドトリホスフェートからキットを製作してもよい。好ましくは、さらに 1 またはそれ以上の親和性標識された増幅プライマーおよび対応する固体支持体をいっしょに組合せたものも含めて製作してもよい。

キットの容器中の試薬の配列は、含まれる特定の試薬によって決まる。各試薬は別々の容器に包装してもよいが、様々な組合せもまた可能である。

以下の具体的な実施例によって本発明を説明するが、それによって本発明の範囲が限られることを意図するものではない。

実施例 1

標識として [³²S] S を用いたアミノ酸残基 112 および 138 に対するコドンにおけるアポリポタンパク質 E 多型性の同定

オリゴヌクレオチドの合成

アプライド バイオシステムズ社 (Applied Biosystems) の 381 A DNA 自動合成機にて、4 つの PCR プライマー (P1 ~ P4) および 2 つの検出段階オリゴプライマー (D1 および D2) を合成した。オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列およびアポリポタンパク質 E 遺伝子 (Apo E) 上でのそれらの位置 (ヌクレオチド番号として示す) は:

- P1: 5'-AAG GAG TTG AAG GCC TAC AAA T
(3616~3637) [配列番号 1]
- P3: 5'-GAA CAA CTG AGC CCG GTG GCG G
(3649~3670) [配列番号 2]
- D1: 5'-GGC CGG ACA TGG AGG ACG TG
(3725~3744) [配列番号 3]
- D2: 5'-ATG CCG ATG ACC TGC AGA AG
(3863~3882) [配列番号 4]
- P2: 5'-TCG CGG GCC CCG GCC TGG TAC A

(3914~3933) [配列番号 5]

P4: 5'-GGA TGG CGC TGA GGC CCG GCT C

(3943~3962) [配列番号 6]

である。

アミノリンク II 試薬 (amisolink II reagent) (アプライド バイオシステムズ社) とともに、プライマー P2 に 5' -アミノ基を加える。そのアミノ基は、スルホ-NH-S-ビチオン (ビニルセケミカル社 (Pierce Chemical Co.)) を用いてビオチン化し、逆相 HPLC により精製した。

DNA サンプル

フィンランド国、ヘルシンキ (Helsinki) のリビッド オートベシヤント クリニック オブ ユニバーシテイ セントラル ホスピタル (Lipid Outpatient Clinic of University Central Hospital) の担当する、知られた Apo E フェノタイプの患者から静脈血サンプルをえた。標準的手順にしたがって、白血球 DNA を抽出した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅

d A T P、d C T P、d G T P、d T T P を各 0.2 mM、10 mM Tris-HCl (pH 8.8)、15 mM (NH₄)₂ SO₄、1.5 mM MgCl₂、0.1% Tween 20、0.1 mg/ml ゼラチン および 1.5 ユニットのサーマス アクアチカス DNA ポリメラーゼ (ユナイテッド ステイツ バイオケミカル社 (United States Biochemical Corp.)) の溶液 100 μl 中、P1 および P4 プライマー (最終濃度 1 μM) とともに DNA (サンプルあたり 100 ng) を DNA サーマ

ルサイクラー (liberal cycler) (パーキン・エルマー／シータス (Perkin-Elmer / Cetus)) にて、1 分間 95℃ および 2 分間 63℃ で 25 サイクル増幅を行なった。この第 1 の PCR 増幅混合物の一部 (1 : 100 希釈の 3 μ l) を第 2 の PCR へ移行した。この第 2 の PCR は、ビオチン化プライマー P 2 および P 3 指令で前述の条件にて行なった。

ビチオン化増幅 A p o E DNA のアビジンコートされたポリスチレン粒子上への親和性捕獲

アビジンコートされたポリスチレン粒子 (0.8 μ m、バクスターヘルスケア社 (Baxter Healthcare Corp.)) の 5% (W/V) 懸濁液の 5 μ l を、第 2 増幅混合物の一部 80 μ l へ加えた。サンプルを 20℃ にて 30 分間保った。エッペンドルフ (Eppendorf) 遠心管中 2 分間遠心して粒子を集め、1 ml の 15mM NaCl、1.5mM Na-クエン酸 (0.1 \times SSC)、0.2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) でボルテックス (vortexing) することにより 1 回、さらに 1 ml の 0.15M NaCl、20mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.5) (PBS) 中 0.1% Tween 20 で 1 回洗浄した。つぎに、粒子を 1 ml の 50mM NaCl、40mM Tris-HCl (pH 7.5) 中 0.1% Tween 20 で 1 回、さらに 1 ml の 50mM NaCl、40mM Tris-HCl (pH 7.5) 中 0.1% Tween 20 で 2 回洗浄した。最後の洗浄溶液中に粒子を懸濁したものを 4 分割し、別々の試験管中遠心により粒子を集めた。

変異ヌクレオチドの同定

DNA 断片を狙った粒子を、2 p モルの検出段階ブラ

BS 中 0.1% Tween 20 にて 2 回、10℃ で洗浄した。反応生成物の溶出のため、粒子を 200 μ l の水中 5 分間煮沸し、氷上で冷却し、エッペンドルフ遠心管中 2 分間遠心した。溶出された放射能を液体シンチレーションカウンタ中で測定した。フェノタイプ E 2/E 2 (コドン 112 で T/T、コドン 138 で T/T)、E 4/E 3 (コドン 112 で T/C、コドン 138 で C/C)、E 2/E 3 (コドン 112 で T/T、コドン 138 で T/C) および E 4/E 4 (コドン 112 で C/C、コドン 138 で C/C) の 4 つのサンプルを前述のようにして分析した実験の結果を以下の表に示す：

サンプル番号	表現形	検出プライマー (コドン)	溶出された放射能 (cpm)		結果
			T-反応	C-反応	
1	E2/E2	D1 (112)	18400	625	T/T
2	E4/E3	D1 (112)	73700	58100	T/C
3	E2/E3	D1 (112)	112000	1360	T/T
4	E4/E4	D1 (112)	2310	99700	C/C
5	DNAなし	D1 (112)	429	1195	
1	E2/E2	D2 (158)	67000	7000	T/T
2	E4/E3	D2 (158)	3220	35100	C/C
3	E2/E3	D2 (158)	44600	26400	T/C
4	E4/E4	D2 (158)	1485	19300	C/C
5	DNAなし	D2 (158)	686	760	

結 論

T-反応および C-反応によってえた cpm の値における差異により、4 つすべての DNA サンプル中コドン

イマーを含む 10 μ l の 30mM NaCl、20mM NaCl₂、40mM Tris-HCl (pH 7.5) 中に懸濁した。変異ヌクレオチド 3745 番 (コドン 112、T または C) に直接隣接して位置する D1 オリゴヌクレオチドを前記試験管の 2 つに加え、変異ヌクレオチド 3733 番 (コドン 138、T または C) に隣接した D2 オリゴヌクレオチドを 2 つの試験管に加えた。サンプルを 63℃ にて 2 分間熱することによりオリゴヌクレオチドを異型 DNA とアニーリングし、20℃ に冷却した。1 μ l の 0.1 M ジチオスライトールならびに [³⁵S]-標識化デオキシヌクレオシドトリホスフェート (dNTP) およびジデオキシヌクレオシドトリホスフェート (ddNTP) を以下のように加えて、最終容積 15 μ l 中各 1 μ M 濃度とした：

- T の同定用：[³⁵] S-dTTP (アマシャム)、ddCTP および ddGTP を、1 本にはオリゴヌクレオチド D1 および 1 本にはオリゴヌクレオチド D2 が入ってアニーリングされた 2 本の試験管に加えた。
- C の同定用：[³⁵] S-dCTP (アマシャム)、ddTTP および ddGTP を、1 本にはオリゴヌクレオチド D1 および 1 本にはオリゴヌクレオチド D2 が入ってアニーリングされた 2 本の試験管に加えた。

T7 DNA ポリメラーゼ (セクニナーゼ (Sequenase) 商標、ユナイテッド ステイツ バイオケミカル社) の 2 μ l (3 U) を各試験管に加え、42℃ にて 6 分間反応を進行させた。微粒子を、1 ml の 0.1 \times SSC、0.2% SDS にて 2 回ボルテックスすることにより 2 回、P

112 およびコドン 138 双方における変異ヌクレオチドを明らかに同定した。

ビオチン化プライマー P 3 およびプライマー P 2 で第 2 の PCR を行なうほかは、前記のようにして変異ヌクレオチドを任意に決定することができる。つぎに、検出段階プライマーとして、A p o E 遺伝子の反対の (opposite) 鎖に相補的なプライマーを用いる：

D4: 5'-GTA CTG CAC CAG GCG GCC GC

(3765~3746) [配列番号 7]

D5: 5'-GGC CTG GTA CAC TGC CAG GC

(3903~3884) [配列番号 8]

実施例 2

1 つの反応に二つの標識化 ([³H] および [³²P]) を用いた、アポリボタンパク質 E 遺伝子のコドン 112 中の変異ヌクレオチドの同定

オリゴヌクレオチドおよび DNA サンプル

この実施例では、実施例 1 で述べた PCR プライマー P 1、ビチオン化された P 2、P 3 および P 4、ならびに検出段階プライマー D 1 を用いた。実施例 1 で述べたようにして、血液サンプルから DNA を抽出した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅および親和性捕獲

実施例 1 に述べたようにして、PCR 増幅および増幅された断片の親和性捕獲を行なった。最後の洗浄段階で、サンプルをそれぞれ 2 分割した。

コドン 112 での変異ヌクレオチドの同定

ただちに3'からコドン112における変異ヌクレオチドへハイブリダイズする検出段階プライマー-D1を2pモル含有する緩衝液(実施例1参照)10μl中に粒子を懸濁した。実施例1で行なったように、アニーリング反応を行なった。0.1Mジチオスライトール1μlを加えた。

[³H]-および[³²P]-標識化されたdNTPを同時に1つのサンプルに加えることによって、変異ヌクレオチド(CまたはT)の同定を今行なった。[³H]-dCTPおよび[³²P]-dTTPまたは[³H]-dTTPおよび[³²P]-dCTP(アマシヤム)のいずれかを用いた。[³H]-dNTPは1μM濃度になるように加えた。[³²P]-dNTPを非標識化dNTP中へ希釈し、最終濃度1μMおよび[³H]-dNTPの比放射能と同様の比放射能とした。すべての反応には1μM ddGTPを含有させた。最終容量を15μlとした。T7DNAポリメラーゼを3ユニット加え、実施例1で行なったように標識化および洗浄の手順を行なった。各サンプルにおいて溶出された[³H]および[³²P]放射能を、ラックベータ(Ricibeta)1213シンチレーションカウンター(ファルマシア/ワラク(Pharmacia/Wallac))で[³H]用ウィンドウをチャンネル10~99に、[³²P]用ウィンドウをチャンネル130~220に合わせるにより測定した。

下の表は、3つのサンプル、フェノタイプE2/E3(コドン112でT/T)の1つ、フェノタイプE4/E4(コドン112でC/C)の1つおよびフェノタイプE3/E4(コドン112でT/C)の1つを、[³H]-

dCTPおよび[³²P]-dTTPを用いるかまたは[³H]-dTTPおよび[³²P]-dCTPを用いるかのいずれかにより、分析した。

サンプル	標識化dNTPs	溶出された放射能(cpm)	
		³ H:Ch. 10~90	³² P:Ch. 130~220
E2/E3	[³ H]dCTP/[³² P]dTTP	502	7870
E4/E4	[³ H]dCTP/[³² P]dTTP	6070	186
E3/E4	[³ H]dCTP/[³² P]dTTP	5120	5980
DNAなし	[³ H]dCTP/[³² P]dTTP	172	148
E2/E3	[³ H]dTTP/[³² P]dCTP	10800	183
E4/E4	[³ H]dTTP/[³² P]dCTP	394	4932
E3/E4	[³ H]dTTP/[³² P]dCTP	7800	5140
DNAなし	[³ H]dTTP/[³² P]dCTP	175	44

結 論

異なる標識を担う2種のdNTPを用いて分割しないサンプルからえたシグナルにより、コドン112における変異ヌクレオチドが同定された。この実施例では、各反応で各サンプルの半量のみを分析した。したがって、サンプルの残り半量をApoE遺伝子のコドン158におけるヌクレオチド変異を分析するのに用いることができる。

実施例3

単回ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)ののちのアポリポタンパク質E遺伝子のコドン158における変異ヌクレオチドの同定

オリゴヌクレオチドおよびDNAサンプル

この実験の結果を下の表に示す：

サンプル	溶出された放射能(cpm)		結 果
	T-反応	C-反応	
E2/E2	64600	7746	T/T
E2/E3	39600	22700	T/C
E4/E3	5640	53500	C/C
DNAなし	1325	1910	

結 論

この方法により、ApoE DNA断片が1つのプライマーペアでの単回PCRにより豊富化されて、位置158での変異ヌクレオチドも正しく同定された。

実施例4

酵素的検出をともしアポリポタンパク質E遺伝子のコドン112における変異ヌクレオチドの同定

オリゴヌクレオチドおよびDNAサンプル

実施例1で述べたPCRプライマーP1、ピオチン化P2、P3およびP4ならびに検出段階プライマーD1を用いた。DNAを実施例1で述べたようにして、血液サンプルから抽出した。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅

実施例1で述べたようにして、プライマーP1およびP4を1μM濃度で用いてDNA(サンプルあたり100

この実施例では、PCR増幅において、ピオチン化プライマーP2およびプライマーP3を用いた。検出段階プライマーはD2であった(実施例1参照)。実施例1に述べたようにして、静脈血よりDNAを抽出した。

ポリメラーゼ連鎖反応増幅および親和性捕獲

1分間94℃、1分間55℃および1分間72℃の30サイクルからなる増幅段階を1回行なっただけであることを除いて、実施例1で述べた条件で、ピオチン化P2およびP3プライマー(最終濃度1μM)を用いてDNA(サンプルあたり100ag)を増幅した。

実施例1で行なったようにして、アビジンコートしたポリスチレン粒子上への親和性捕獲を行なった。最終洗浄段階において、各サンプルを2つに分割した。

コドン158における変異ヌクレオチドの同定

コドン158の変異ヌクレオチドの3'と直接ハイブリダイズする検出段階プライマー-D2を2pモル含有する緩衝液(実施例1参照)10μl中に粒子を懸濁した。実施例1で行なったようにアニーリング反応を行なった。

0.1Mジチオスライトール1μlを加えた。実施例1に述べたようにして、T-およびC-反応に[³⁵S]-標識化dNTPおよびddNTPを加えた。実施例1に述べたようにして、プライマー延長反応、洗浄手順および結合放射能の溶出を行なった。

フェノタイプE2/E2(コドン158でT/T)、E2/E3(コドン158でT/C)およびE4/E3(コドン158でC/C)を有する3つのサンプルを分析した。

1g)を増幅した。この第1 PCR混合物の1:100希釈の3 μ lを、ビオチン化P2およびP3プライマーを0.1 μ M濃度で用いて、再増幅した。第2のPCRは、1分間95℃、1分間55℃および1分間72℃で30サイクル行なった。

アビジンコートされたマイクロタイター用ウェル中での増幅DNAの親和性捕獲

第2のPCR混合物のサンプルあたり15 μ l \times 2をストレプトアビジンで受動性吸収によりコートされたマイクロタイター用ウェル(メンク(Nunc)、マキシソルブ(Maxisorb))へ移した。0.15M NaCl、0.1M Tris-HCl、pH7.5(TBS)中0.1%Tween20を各ウェル30 μ l加えた。このマイクロタイター用プレートをゆるく振とうしながら37℃にて3時間インキュベートした。ウェルを20℃にて200 μ lのTBS中0.1%Tween20で3回洗浄した。つぎに、ウェルを20℃にて50 μ M NaOH 100 μ lで5分間、2回処理を行なった。つづいて、200 μ lの0.1 \times SSC、0.1%SDSで2回、TBS中0.1%Tween20で2回、50 μ M NaCl、40 μ M Tris-HCl、pH7.5中0.1%Tween20で1回ならびに最後に50 μ M NaCl、40 μ M Tris-HCl、pH7.5中0.01%Tween20で1回洗浄した。

変異ヌクレオチドの同定

50 μ lの0.9M NaCl、0.2M Tris-HCl、pH7.5中10pモルオリゴヌクレオチドD1を各ウェルに加えた。ウェルを55℃にて2分間熱し、ゆっくり20℃まで冷却した。混合物を捨て、20℃にて200 μ lの0.25M NaCl

0.2M Tris-HCl、pH7.5で1回ウェルを洗浄した。1 μ Mジゴキシゲニン-11-d UTP(ペーリンガー-マンハイム(Boehringer-Mannheim))、1 μ M ddCTP、1 μ M ddGTP、0.2 μ MオリゴヌクレオチドD1、6 μ Mジチオスライトール、37.5 μ M NaCl、15 μ M MgCl₂、33 μ M Tris-HCl、pH7.5および3ユニットのT7 DNAポリメラーゼを含む溶液30 μ lを加えた。マイクロタイター用プレートを42℃にて10分間インキュベートした。200 μ lの0.1 \times SSC、0.1%SDSで2回、200 μ lのTBS中0.1%Tween20で3回ウェルを洗浄した。つぎにTBS中0.1%Tween20、1%牛血清アルブミンの溶液で1:500希釈した抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼコンジュゲート(ペーリンガー-マンハイム)50 μ lを加え、マイクロタイター用プレートをゆるく振とうしながら37℃にて2時間インキュベートした。TBS中0.1%Tween20で6回、1Mジエタノールアミン-0.5M MgCl₂緩衝液、pH10で1回、ウェルを洗浄した。最後にアルカリ性の緩衝液中2 μ g/ μ l p-ニトロフェニルフェスフェート50 μ lを加えた。顕色ののち20分間室温にてアルカリ性緩衝液100 μ lを加えて、形成された生成物の吸光度を分光光度計で495nmにて測定した。

フェノタイプE2/E2(コドン112でT/T)およびE4/E4(コドン112でC/C)を有する2つのサンプルを分析した。この実験の結果を以下の表に示す。

サンプル	405nmでの吸光度 (サンプル2つづつ)		結果
E2/E2	1.180	0.707	T/T
E4/E4	0.040	0.010	C/C
DNAなし	0.025	0.010	

結 論

ジオキシゲニン-11-d UTPの取り込みおよびピキックアルカリホスファターゼで標識された抗体での検出ののち、コドン112における変異ヌクレオチドを同定した。

実施例5

蛍光標識を用いたアミノ酸残基112に対するコドンにおけるアポリポタンパク質E多型性の同定

オリゴヌクレオチドおよびDNAサンプル

実施例1で述べたPCRプライマーP1、ビオチン化P2、P3およびP4ならびに検出段階プライマーD1を用いる。DNAを実施例1で述べたようにして血液サンプルから抽出する。

ポリメラーゼ連鎖反応および親和性捕獲

実施例1で述べたようにして、プライマーP1およびP4を用いてDNA(サンプルあたり100 μ g)を増幅する。この第1PCR混合物を1:100希釈したもの3 μ lをビオチン化P2およびP3プライマーを1 μ M濃

度にて用いて再増幅する。第2のPCRは、1分間95℃、1分間55℃および1分間72℃にて25サイクル行なう。実施例1のように、ビオチン化増幅されたDNA断片をアビジンコートしたポリスチレン粒子上に捕獲する。最後の洗浄段階で各サンプルを2つの部分に分割する。

コドン112における変異ヌクレオチドの同定

増幅したDNAを担う粒子を、コドン112における変異ヌクレオチドの3'と直接ハイブリダイズする検出段階プライマーを5pモル含有する緩衝液(実施例1参照)10 μ l中に懸濁する。実施例1と同様にアニリング反応を行なう。各試験管に0.1Mジチオスライトール1 μ lを加える。Tの同定のために、400 μ Mの蛍光ddTTP(T-ターミネーター;デュボン(Dupont)、NEX-528T)を試験管の1つに加える。Cの同定のために、400 μ Mの蛍光ddCTP(C-ターミネーター;デュボン、NEX-519C)を他の試験管に加える。T7 DNAポリメラーゼ5ユニットを、最終反応容量が15 μ lとなるように両方の試験管に加える。5分間55℃にて反応を進行させる。実施例1で述べたようにして粒子を洗浄し、反応生成物を溶出させる。溶出物の蛍光を、励起波長として490nmおよび発する蛍光の測定のために550nmを用いて分光光度計(メルク/日立(Merk/Hitachi、F-1000))にて測定する。

結果の解釈

T-反応のみからの陽性シグナルにより、被検物は位置112のシステイン残基に対するホモ接合であることが

示される。

C-反応のみからの陽性シグナルにより、被検物は位置112のアルギニン残基に対するホモ接合であることが示される。

両方の反応からの陽性シグナルにより被検物はヘテロ接合である、すなわちアポリポタンパク質E遺伝子の位置112にシステイン残基を有する1つの対立遺伝子およびアルギニン残基を有する1つの対立遺伝子を有する。

実施例6

ヒトβ-グロビン遺伝子のコドン6をコードする配列における鎌状赤血球突然変異の検出

オリゴヌクレオチドの合成

β-グロビン遺伝子にミスマッチするかまたは強く相補的である3'末端を含有するようにPCRプライマーを設計する。B1およびB2で示される2つのPCRプライマーならびに1つの検出段階プライマーB3を実施例1で述べた方法により合成する。プライマーB2を実施例1で述べたようにビオチン化する。オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列およびそれらのβ-グロビン遺伝子上での位置(転写開始部位に対するヌクレオチド番号として)は以下のとおりである。

B1: 5'-CAT TTG CTT CTG ACA CAA CT
(-49~-30) [配列番号9]

B3: 5'-CAT GGT GCA CCT GAC TCC TG
(-1~19) [配列番号10]

B2: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

せて溶出された放射能を実施例1で述べたように、シンチレーションカウンターで測定する。

結果の解釈

A-反応のみからの陽性シグナルは被検物がホモ接合であり正常であることを示す。

T-反応のみからの陽性シグナルは被検物が鎌状赤血球に対してホモ接合であることを示す。

両方の反応からの陽性シグナルは被検物は1つの対立遺伝子中に鎌状赤血球突然変異を担う、すなわちヘテロ接合であることを示す。

前記のように、ビオチン化プライマーB1およびB2を用いてPCRを行なうことを除いて、変異ヌクレオチドを任意に決定することができる。検出段階プライマーとして、さらに、β-グロビン遺伝子の反対の鎖に相補的なプライマーを用いる:

B4: 5'-CAG TAA CGG CAG GCG GCC GC
(40~21) [配列番号12]

実施例7

囊胞性線維症におけるΔF508欠損の同定

オリゴヌクレオチドプライマーの合成

2つの増幅プライマー(CF1およびCF3)および1つの検出段階プライマー(CF2)を実施例1で述べたように合成した。プライマーは、CF遺伝子の既知のヌクレオチド配列(リオルゲン(Riordan)ら、サイエンス1989; 245: 1066~1072)に基づいて設計した。プ

ポリメラーゼ連鎖反応増幅および親和性捕獲

実施例1で述べたようにして血液サンプルからDNAを抽出する。実施例3で述べたようにして、プライマーB1およびビオチン化B2を用いてDNA(サンプルあたり100ng)を増幅する。実施例1のように、ビオチン化増幅されたDNA断片をアビジンコートしたポリスチレン粒子上に捕獲する。各固定化サンプルを2つの部分に分割する。

コドン6におけるA-T突然変異の同定

増幅されたDNAサンプルを担っている粒子を、コドン6中突然変異部位の3'と直接ハイブリダイズするB3検出段階プライマー2pモルを含有する緩衝液(実施例1参照)10μl中に懸濁する。実施例1のようにアニーリング反応を行なう。0.1Mジチオスライトール1μlを加える。以下のように[³⁵S]-標識化dNTPおよびddNTPを加え、最終容量15μl中0.2μM濃度とする:

- 正常対立遺伝子(A)の同定のために:
[³⁵S]-dATP、ddTTP、ddGTPを試験管のうち1本へ
- 突然変異(T)の同定のために: [³⁵S]-dTTP、ddATP、ddGTPを他の試験管へ加える。

T7DNAポリメラーゼ1ユニットを加え、37℃にて5分間反応させる。粒子を洗浄し、反応生成物を溶出さ

イマーの配列およびCF遺伝子上の位置は:

CF1: 5'-CTG GAG CCT TCA GAG GGT AAA AT-3'
(1555~77) [配列番号13]

CF2: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT-3'
(1629~32) [配列番号14]

CF3: 5'-CAT GCT TTA ATG ACG CTT CTA TA-3'
(1703~81) [配列番号15]

であった。

プライマーCF3を実施例1で述べたようにビオチン化した。

DNAサンプル

標準的な方法によりΔF508突然変異に関して臨床的に特効づけされている、フィンランド人の囊胞性線維症患者の白血球から標的DNAを抽出した。

標的DNAのPCR増幅および親和性捕獲

1分間94℃、1分間60℃および1分間72℃の31サイクルからなる唯一つの増幅過程を行なったということを除いては、実施例1で述べた条件にて、ビオチン化CF3およびCF1プライマー(最終濃度、それぞれ0.15μMおよび0.6μM)でDNA(サンプルあたり100~200ng)を増幅した。

ストレプトアビジンコートされたマイクロタイター用ウェル上への親和性捕獲を実施例4で述べたように行なった。

変異ヌクレオチドの同定

検出段階プライマーの延長を、 $0.2 \mu\text{M}$ のプライマー CF 2 および 2 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼを含有する $50 \mu\text{l}$ の 50mM Tris-HCl、 $\text{pH} 8.8$ 、 1.5mM MgCl_2 、 15mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $50 \mu\text{g}$ 、 0.1% Tween 20、 0.01% ゼラチン中、述べたように行なった。T の同定のために $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -d T T P (アマシヤム) および $0.8 \mu\text{M}$ d d G T P、ならびに C の同定のために $2 \mu\text{Ci}$ ^3H -d C T P、 $0.8 \mu\text{M}$ d d T T P を平行な 2 列のウェルに入れ、そのプレートを 55°C にて 10 分間インキュベートした。 $200 \mu\text{l}$ の T B S 緩衝液中 0.1% Tween 20 で 3 回ウェルを洗浄し、取込まれた標識を $50 \mu\text{l}$ の 50mM NaOH で、室温にて、5 分間溶出させ、液体シンチレーションカウンターで測定した。

この実施例では、C F T R 遺伝子のヌクレオチド 1653 における遺伝子型 C / C、T / T および T / C を有する 3 つのサンプル、すなわち 1 つの正常なホモ接合体、1 つの $\Delta F 508$ ホモ接合体および 1 つのヘテロ接合体を用いた。あらかじめこれらのサンプルの遺伝子型を他の方法 (ケレ (Kere) ら、ヒューマン ジェネティクス (Hum. Genet.), 1990: 85: 413~415) によりあらかじめ決定した。下の表の結果は、各遺伝子型の同定が明確であることを示す。

[以下余白]

(1~30) [配列番号15]

R2:5'-TTC GTC CAC AAA ATG ATT CTG

(34~74) [配列番号17]

R3:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CCA

(56~36) [配列番号18]

R4:5'-AGG CAC TCT TGC CTA CGC CAC

(55~35) [配列番号19]

ポリメラーゼ連鎖反応増幅、親和性捕獲および検出段階プライマーのアニーリング

プロテイナーゼ K での消化、フェノール抽出およびエタノール沈殿を用いる標準的な方法により細胞サンプルから DNA を抽出する。プライマーのアニーリング温度を 50°C にする以外は実施例 3 で述べた条件を用いて、ビオチン化プライマー R 1 およびプライマー R 2 にて $100 \mu\text{g}$ の精製された DNA を増幅する。増幅された DNA をアビジンコートされたポリスチレン粒子上に捕獲し、変性させて実施例 1 で述べたようにして粒子を洗浄する。固定化された DNA サンプルを 2 本の試験管に分ける。その試験管の 1 本中の粒子をコドン 12 における第 2 の G に相補的な C の 3' と直接アニーリングする 2p モルのオリゴヌクレオチド R 3 を含有する緩衝液 (実施例 1 参照) $10 \mu\text{l}$ 中に懸濁する。他の試験管ではコドン 12 における第 1 の G に相補的な C にアニーリングする 2p モルのオリゴヌクレオチド R 4 を含有する $10 \mu\text{l}$ の緩衝液を用いる。アニーリング反応を、実施例 1 におけると同様にして行なう。 0.1M ジチオスライトールを $1 \mu\text{l}$ 加える。コドン 12 における突然変異を以下の方法 A または方法 B

サンプル	^3H -d T T P (cpm)	^3H -d C T P (cpm)	cpm C / cpm T 遺伝子型 ×)
正常ホモ接合体	349	9832	28.2 C / C
$\Delta F 508$ ホモ接合体	11539	52	0.005 T / T
ヘテロ接合体	11358	7457	0.66 T / C

×) C F T R 遺伝子のヌクレオチド 1653

結 論

サンプルの遺伝子型を、 ^3H -d T T P および ^3H -d C T P の取り込みののち c p m C / c p m T 比率によって確かめた。

実施例 8

K - r a s 遺伝子のコドン 12 をコードする配列における点突然変異の検出

オリゴヌクレオチドの合成

R 1 および R 2 で示される 2 つの P C R プライマーをそれぞれ合成し、プライマー R 1 を実施例 1 で述べたようにビオチン化する。位置 12 におけるグリシン残基 (G G T によりコードされている) の突然変異の検出のために、2 つの検出段階プライマー、R 3 および R 4 を合成した。K - r a s 遺伝子の第 1 のエクソン上のオリゴヌクレオチドの配列および (ヌクレオチド番号としての) 位置を以下に示す:

R1:5'-ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG

により分析する。

A. コドン 12 におけるグリシンから非グリシンへの突然変異の同定

$[^{35}\text{S}]$ -d A T P、 $[^{35}\text{S}]$ -d G T P、 $[^{35}\text{S}]$ -d T T P および d d C T P の混合物を各 $15 \mu\text{l}$ 中最終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように両方の試験管に加える。1 ユニットの T 7 DNA ポリメラーゼを加え、 37°C にて 5 分間反応を進行させる。粒子を洗浄し、反応生成物を溶出させ、溶出した放射能を実施例 1 で述べたようにシンチレーションカウンターで測定する。

R 3 をアニーリングした試験管からの陽性のシグナルにより、サンプル中の K - r a s 遺伝子の少なくとも 1 部が位置 12 においてバリン (G T T でコードされている)、アスパラギン酸 (G A T) またはアラニン (G C T) 残基へ突然変異していることが示される。

R 4 をアニーリングした試験管からの陽性のシグナルにより、K - r a s 遺伝子の少なくとも 1 部が位置 12 にシステイン (T G T)、セリン (A G T) またはアルギニン (C T G) 残基があることが示される。

両方の試験管からのシグナルが欠けていることにより、両方のアレルにおけるコドン 12 がグリシン残基をコードする正常な G G T であることが示される。

B. コドン 12 における突然変異の特徴づけ

突然変異の正確な特徴づけを、両方の試験管に $[^{32}\text{P}]$ -d A T P、 $[^{35}\text{S}]$ -d G T P、 $[^3\text{H}]$ -d T T P および d d C T P の混合物を $15 \mu\text{l}$ 中最終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように加えることによって行なう。 $[^{32}\text{P}]$ -d A

T P および [^{35}S] - d G T P を、[^3H] - d T T P の比放射能 (約 100 Ci/m モル) と同様の比放射能を生じるように、それぞれ非標識化 d A T P および d G T P 中に希釈する。その3種の放射性同位体の間でのシンチレーションカウンタ能力における差異を考慮して、測定に用いられるチャンネル (下記参照) において等しい c p m 値を生じるであろう反応混合物を設計する。

1 ユニットの T 7 D N A ポリメラーゼを加え、37℃にて5分間反応を進行させる。粒子を洗浄し、反応生成物を実施例1に述べたように溶出させる。

溶出された生成物中の [^3H]、[^{35}S] および [^{32}P] により放射される放射能をシンチレーションカウンタで同時に測定する。ラックベータ1219カウンタ (ファルマシア/ワラック) において、以下のウインドウセッティングを用いる: [^3H] の測定のために: チャンネル10~90、[^{35}S] の測定のためにチャンネル95~145 および [^{32}P] の測定のためにチャンネル170~220。結果の解釈の前に、[^{35}S] から [^3H] チャンネルへのシグナルのオーバーフロー (24%) に対する、および [^{32}P] から [^{35}S] チャンネルへのシグナルのオーバーフロー (13%) に対する修正を行なう。

結果は、以下の表に示すように解釈される:

[以下余白]

検出段階プライマー	シグナル			結果	
	^3H	^{35}S	^{32}P	コドン12	アミノ酸
R3	+	-	-	GAT	アスパラギン酸
R3	-	+	-	GCT	アラニン
R3	-	-	+	GTT	バリン
R3	-	-	-	GGT	グリシン
R4	+	-	-	AGT	セリン
R4	-	+	-	CGT	アルギニン
R4	-	-	+	TGT	システイン
R4	-	-	-	GGT	グリシン

K - r a s 遺伝子のコドン12における突然変異を、ピオチン化プライマー R 2 およびプライマー R 1 を用いた P C R を行なうほかは、上述のように任意に決定することができる。その際 K - r a s 遺伝子の反対ストランドに相補的なプライマー:

R5: 5'-AAC TTG TGG TAG TTG GAG CT

(14~13) [配列番号20]

R5: 5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG

(13~14) [配列番号21]

を検出段階プライマーとして用いる。

実施例9

非突然変異細胞存在における N - r a s 遺伝子中コドン12をコードする配列中の点突然変異の検出

オリゴヌクレオチドの合成

X 1 および X 2 で示される2つの P C R プライマーをそれぞれ合成し、プライマー X 1 を実施例1で述べたようにしてピオチン化する。コドン12における第2のヌクレオチド (G が A で置換される) の突然変異の検出のために、検出段階プライマー X 3 を合成する。オリゴヌクレオチドの配列および N - r a s 遺伝子の第1のエキソン上の (ヌクレオチド番号としての) 位置は以下のとおりである:

X1: 5'-GAC TGA GTA CAA ACT GGT GG

(3~22) [配列番号22]

X2: 5'-CTC TAT GGT GGG ATC ATA TT

(111~91) [配列番号23]

X3: 5'-ACT GGT GGT GGT TGG AGC AG

(13~34) [配列番号24]

DNA サンプル

N - r a s 遺伝子のコドン12の2番目の位置にヌクレオチド置換 (G → A) を有することが知られる細胞株 (細胞株 P A - 1、A T C C C R L 1 5 7 2) を、A M L 患者の治療の退却の間から、患者の細胞サンプルを最少の残基突然変異細胞について分析することができる状態をまねたモデル系として用いた。

P A - 1 からのおよび正常ヒト白血球からの DNA を実施例7で行なったのと同様に標準的方法によって抽出し、突然変異細胞が 100% から 0.1% で表わされる一連のサンプルを生じるように混合した。

ポリメラーゼ連鎖反応増幅

実施例3で述べた条件で、プライマー X 1 および X 2 を用いて、抽出した DNA (サンプルあたり 100 ng) を増幅した。

ストレプトアビジンコートされた磁気粒子上への親和性捕獲および検出段階プライマーのアニーリング

100 μg のストレプトアビジンコートされた磁気ポリスチレンビーズ (ダイナビーズ (Dynabeads)、登録商標、M-280、ストレプトアビジン、Dynal AS) に、80 μl の増幅混合物および 20 μl の 1 M NaCl を加えた。サンプルを 20℃ にて 30 分間保持し、磁気粒子コンセンレータ (M P C - E、Dynal AS) を用いて反応混合物からビーズを分離して、混合物を捨てた。ビーズを 1 ml の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5、0.1% Tween 20 中 0.5 M NaCl で 3 回洗浄し、2 p モルの検出段階プライマー X 3 を含有する 100 μl の 50 mM NaCl、20 mM MgCl₂、40 mM Tris-HCl、pH 7.5 で 2 回処理した。37℃ にて 10 分間、プライマーを鈍型 DNA へアニーリングさせた。1 μl の 0.1 M ジチオスライトール、15 p モルの ^3H 標識化 d T T P および 1 ユニットの T 7 D N A - ポリメラーゼ (ユナイテッド ステイテッド バイオケミカル コーポレーション (United States Biochemical Corporation)) を加えて最終濃度 15 μl とした。37℃ にて 5 分間反応を進行させた。ビーズを 3 回洗浄し、20℃ にて 5 分間 100 μl の 50 mM NaOH、0.15 M NaCl 100 μl で処理した。溶出した放射能を液体シンチレーションカウンタで測定した。結果を以下の表に示す:

PA-1細胞における最少の点突然変異の検出	
突然変異細胞 (%)	³ H取り込み (cpm) *
50	23,000
5	3,400
0.5	800
0	490

(*) コドン12中A (GAT) に対応する³Hの取り込み

結 論

結果より、本発明の方法は、正常DNAのバックグラウンドから0.25%ほどの少量の突然変異した単一对立遺伝子性N-ras DNAを検出することが示される。この感度は、AML患者の判別のためならびに治療中の同定された突然変異の監視および疾病の追跡のために必要な範囲にうまく入っている。

実施例 10

HIV-1 逆転写酵素遺伝子のコドン215 (アミノ酸配列番号はNH₂末端プロリンに属している) をコードする配列中の点突然変異 (A→T) の検出

オリゴヌクレオチドの合成

実施例1で述べた方法により、2つのPCRプライマー (H1およびH2) ならびに1つの検出段階プライマー (H3) を合成する。実施例1で述べたようにしてプライマーH2をビオチン化する。オリゴヌクレオチドの

リメラーゼ (プロメガ (Promega)) を含有する、T-反応のためには: 1 μCi の ³H-dTTP (98 Ci/mmol) および 0.8 μM の ddATP および ddCTP を含有する、30 mM Tris-HCl、pH 8.8、1.5 mM MgCl₂、15 mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Tween 20、0.01%ゼラチンおよび 0.2 μM のプライマーH3中、50℃にて10分間、検出プライマーH3のアニーリングおよび検出反応を同時に行なう。ウェルをTBS中 0.1% Tween 20で3回洗浄し、室温にて5分間30 mM NaOH 60 mM で放射能を溶出させる。溶出した放射能を液体シンチレーションカウンターで測定する。

結果の解釈

A-反応のみからの陽性シグナルは、単離されたウイルスが野生型であることを示す。T-反応のみからの陽性シグナルは、単離されたウイルスがコドン215の第1のヌクレオチドに突然変異を有することを示す。したがって、アミノ酸ThrはPheまたはTyrに変わっている。両方の反応からの陽性の反応は、ウイルスが野生型ウイルスと突然変異したウイルスの混合集団であることを示す。

同じ増殖生成物から同様の方法においてコドン67および103中の変異ヌクレオチドを決定することができる。

ヌクレオチド配列およびそれらのHIV-1逆転写酵素遺伝子上の位置 (ヌクレオチド番号づけはラトナー (Ratner) ら、1985、ネイチャー 313: 277-281に従っている) は以下のとおりである:

H1: 5'-GAG AAT CCA TAC AAT ACT CCA
(2286-2306) [配列番号25]
H2: 5'-TAA CCC ATC CAA AGG AAT GGA
(2324-2304) [配列番号26]
H3: 5'-ATC TGT TGA GGT GGG GAC TT
(2752-2771) [配列番号27]

ポリメラーゼ連鎖反応増幅および親和性捕獲

実施例1で述べたようにしてHIV-1感染細胞からDNAを抽出する。プライマーアニーリング温度を50℃とする以外は、実施例1で述べたようにして、プライマーH1およびH2 (最終濃度 0.2 μM) を用いて、DNA (サンプルあたり100 ng) を増幅する。ビオチン化増幅されたDNA断片を、実施例4で述べたようにストレプトアビジンコートされたマイクロタイター用プレートウェル上に捕獲する。各サンプルを、2列の平行なウェルに結合する。マイクロタイター用プレートウェルに結合したDNA断片を実施例4で述べたように変性させ、洗浄する。

コドン215中のA→T突然変異の同定

A反応のためには: 1 μCi の ³H-dATP (82 Ci/mmol、アマシヤム、英国) の 0.8 μM の ddTTP および ddCTP ならびに1ユニットの Taq DNAポリ

配列表

(1) 一般情報

- (i) 出願人: オリオン・ニヒチュメ
オサケ・ユキチュア
(ii) 発明の名称: 特定のヌクレオチド変異の
決定のための方法および試薬
(iii) 配列の数: 27
(iv) 通信住所:

オリオン コーポレーション
オリオン ファルマセウチカ
パテント デパートメント
ペーオーボックス 65
02102 エスポー
フィンランド共和国

(v) コンピューター リーダブル フォーム: < >

(A) ミディアム タイプ: < >

(B) コンピューター: < >

(C) オペレーティング システム: < >

(C) ソフトウェア: < >

(vi) 現行出願データ

(A) 出願番号: 決定される予定

(B) 出願日:

(C) 分類:

(2) 配列番号1についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22塩基

- (B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 1
AAG GAG TTG AAG GCC TAC AAA T 22
- (2) 配列番号 2 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 2 塩基
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 2
GAA CAA CTG AGC CCG GTG GCG G 22
- (2) 配列番号 3 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 3
GCG CGG ACA TGG AGG ACG TG 20
- (2) 配列番号 4 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 7
GTA CTG CAC CAG GCG GCC GC 20
- (2) 配列番号 8 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 2
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 8
GGC CTG GTA CAC TGC CAG GC 22
- (2) 配列番号 9 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 9
CAT TTG CTT CTG ACA CAA CT 20
- (2) 配列番号 10 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 10
CAT GGT GCA CCT GAC TCC TG 20
- (2) 配列番号 11 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 11
CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 20
- (2) 配列番号 12 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 12
CAG TAA CGG CAG GCG GCC GC 20
- (2) 配列番号 13 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 3
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 13
- (C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 4
ATG CCG ATG ACC TGC AGA AG 20
- (2) 配列番号 5 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 2
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 5
TCG CGG GCC CCG GCC TGG TAC A 22
- (2) 配列番号 6 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 2
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(ii) 分子の種類 : D N A
(xi) 配列の記載 : 配列番号 6
GGA TGG CGC TGA GGC CGC GCT C 22
- (2) 配列番号 7 についての情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ : 2 0
(B) 型 : 核酸
(C) トポロジー : 直鎖状
(xi) 配列の記載 : 配列番号 10
CAT GGT GCA CCT GAC TCC TG 20

CTG GAG CCT TCA GAG GGT AAA AT	23	(2) 配列番号 17 についての情報:	
(2) 配列番号 14 についての情報:		(i) 配列の特徴:	
(i) 配列の特徴:		(A) 長さ: 21	
(A) 長さ: 24		(B) 型: 核酸	
(B) 型: 核酸		(C) トポロジー: 直鎖状	
(C) トポロジー: 直鎖状		(ii) 分子の種類: DNA	
(ii) 分子の種類: DNA		(iii) 配列の記載: 配列番号 17	
(iii) 配列の記載: 配列番号 14		TTC GTC CAC AAA ATG ATT CTG	21
TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT	24	(2) 配列番号 18 についての情報:	
(2) 配列番号 15 についての情報:		(i) 配列の特徴:	
(i) 配列の特徴:		(A) 長さ: 21	
(A) 長さ: 23		(B) 型: 核酸	
(B) 型: 核酸		(C) トポロジー: 直鎖状	
(C) トポロジー: 直鎖状		(ii) 分子の種類: DNA	
(ii) 分子の種類: DNA		(iii) 配列の記載: 配列番号 18	
(iii) 配列の記載: 配列番号 15		AAG GCA CTC TTG CCT ACG CCA	21
CAT GGT TTA ATG ACG CTT CTA TA	23	(2) 配列番号 19 についての情報:	
(2) 配列番号 16 についての情報:		(i) 配列の特徴:	
(i) 配列の特徴:		(A) 長さ: 21	
(A) 長さ: 21		(B) 型: 核酸	
(B) 型: 核酸		(C) トポロジー: 直鎖状	
(C) トポロジー: 直鎖状		(ii) 分子の種類: DNA	
(ii) 分子の種類: DNA		(iii) 配列の記載: 配列番号 19	
(iii) 配列の記載: 配列番号 16		AGG CAC TCT TGC CTA CGC CAC	21
ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG	21		
		(i) 配列の特徴:	
(2) 配列番号 20 についての情報:		(A) 長さ: 20	
(i) 配列の特徴:		(B) 型: 核酸	
(A) 長さ: 18		(C) トポロジー: 直鎖状	
(B) 型: 核酸		(ii) 分子の種類: DNA	
(C) トポロジー: 直鎖状		(iii) 配列の記載: 配列番号 23	
(ii) 分子の種類: DNA		CTC TAT GGT GGG ATC ATA TT	20
(iii) 配列の記載: 配列番号 20			
AAC TTG TGG TAG TTG GAG CT	18	(2) 配列番号 24 についての情報:	
(2) 配列番号 21 についての情報:		(i) 配列の特徴:	
(i) 配列の特徴:		(A) 長さ: 20	
(A) 長さ: 18		(B) 型: 核酸	
(B) 型: 核酸		(C) トポロジー: 直鎖状	
(C) トポロジー: 直鎖状		(ii) 分子の種類: DNA	
(ii) 分子の種類: DNA		(iii) 配列の記載: 配列番号 24	
(iii) 配列の記載: 配列番号 21		ACT GGT GGT GGT TGG AGC AG	20
ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG	18	(2) 配列番号 25 についての情報:	
(2) 配列番号 22 についての情報:		(i) 配列の特徴:	
(i) 配列の特徴:		(A) 長さ: 21	
(A) 長さ: 20		(B) 型: 核酸	
(B) 型: 核酸		(C) トポロジー: 直鎖状	
(C) トポロジー: 直鎖状		(ii) 分子の種類: DNA	
(ii) 分子の種類: DNA		(iii) 配列の記載: 配列番号 25	
(iii) 配列の記載: 配列番号 22		GAG AAT CCA TAC AAT ACT CCA	21
GAC TGA GTA CAA ACT GGT GG	20	(2) 配列番号 26 についての情報:	
(2) 配列番号 23 についての情報:		(i) 配列の特徴:	

(A) 長さ : 2 1
 (B) 型 : 核酸
 (C) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 分子の種類 : D N A
 (iii) 配列の記載 : 配列番号 2 6
 TAA CCC ATC CAA AGG AAT GGA

21

検出段階
 プライマー : 5'- Y Y Y Y Y Y Y Y Y

固定化された
 標的 : 3'- X X X X X X X X X₁X'X X X X - 付着部分
 X₂

加えられたヌクレオシドトリホスフェート : a) ddY₁* または ddY₂*
 b) ddY₁* および ddY₂*
 c) dY₁ (および ddY₁*)
 d) dY₁* および dY₂+

FIG. 1

(2) 配列番号 2 7 についての情報 :
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 2 0
 (B) 型 : 核酸
 (C) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 分子の種類 : D N A
 (iii) 配列の記載 : 配列番号 2 7
 ATC TGT TGA GGT GGG GAC TT

20

検出段階
 プライマー : 5'- Y Y Y Y Y Y Y Y Y

固定化された
 標的 : 3'- X X X X X X X_nX₁X'X X X X - 付着部分

加えられたヌクレオシドトリホスフェート : a) もし X_nがX₁でもX₂でもないとき
 にのみ
 dY_nおよび (ddY₁* または
 ddY₂*)

FIG. 2

検出段階
 プライマー : 5'- Y Y Y Y Y Y Y Y Y
 5'- Y Y Y Y Y Y Y Y Y₁
 5'- Y Y Y Y Y Y Y Y Y₂

固定化された
 標的 : 3'- X X X X X X X₁X₃X X X X - 付着部分
 X₂X₄

加えられたヌクレオシドトリホスフェート : 段階 1 : ddY₁* および / または ddY₂*
 段階 2 : ddY₃* および / または ddY₄*

FIG. 3

平成4年8月12日

特許庁長官 麻 生 渡 殿



変異ヌクレオチドの検出はプライマー延長および検出可能なヌクレオシドトリホスフェートの取り込みに基づくものである。変異ヌクレオチドに直接に隣接する領域から検出段階プライマーを選択することにより、1つのヌクレオシドトリホスフェートほど少ない取り込みの後でも検出することができる。変異ヌクレオチドとマッチする標識化ヌクレオシドトリホスフェートを測定する。検出段階プライマーの選択は本発明の方法にとって重要であり、関心のあるヌクレオチド配列によって決まる。好ましくは検出すべき変異ヌクレオチドから3'末端方向の領域に直接及ぶように検出段階プライマーを選ぶ。本方法は、特定の点突然変異および遺伝子変異の同定において有用である。

1 特許出願の表示

PCT/FI91/00046

2 発明の名称

特定のヌクレオチド変異の決定のための方法および試薬

3 特許出願人

住 所 フィンランド共和国、02100 エスポー、
オリオンチニ 1
名 称 オリオン-ユヒチュメ オサケ ユキチュア
国 籍 フィンランド共和国

4 代 理 人 〒540

住 所 大阪市中央区谷町二丁目2番22号

NSビル

氏 名 (6522) 弁理士 朝 日 奈 宗

電話 (06) 941-8922 (代)



住 所 同 所

氏 名 (9825) 弁理士 佐 木 啓



住 所 同 所

氏 名 (9846) 弁理士 河 村



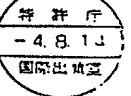
5 補正書の提出年月日

1992年1月20日

6 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1 通



237362)、(ii) 変性勾配電気泳動 (denaturing gradient electrophoresis) により分析されたハイブリッドの安定性の相異または(iii) ミスマッチの部位での化学的開裂 (ヨーロッパ特許公開EP-329311) に基づく。

変異ヌクレオチドの部位に相補的な3'末端を有するオリゴヌクレオチドが、対立遺伝子特異的プライマーとして用いられている (ヨーロッパ特許公開 EP-332135)。変異ヌクレオチドの同定は、3'末端のミスマッチはポリメリゼーション反応を阻害するという事実にもとづく。オリゴマーリゲーションアッセイにおいて同様の方法が用いられる。その方法では、2つの隣接するオリゴヌクレオチドが、その末端で完全にマッチするときにのみ、それらのオリゴヌクレオチドはリゲーションされる (ヨーロッパ特許公開EP-336731)。

国際特許公開 90-90/10414 には、対立遺伝子特異的なプライマー延長により増幅された断片におけるDNA配列変異の検出の方法が述べられている。この方法では、取り込まれた標識を検出するためにいくつかのゲル分離段階が必要である。

制限酵素でのDNA配列の開裂は、変異ヌクレオチドが、特定の制限部位を、たとえばつくるまたは壊すなど、変更するという条件に、変異の同定に用いられる。ヌクレオチド配列決定は、変異ヌクレオチドの決定のために最も有益な方法である。

上で述べた方法は比較的複雑な手順であり、そのためルーチンの診断における使用が困難であるという欠点を有する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ

の使用には、それぞれの適用について別々に反応条件を注意深く最適にすることが必要とされる。上の方法のいくつかには、ゲル電気泳動による分画が必要である。そのような方法は、容易に自動化されない。

請求の範囲

1. 少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合した第1の付着部分を含有している標的増幅反応を行なうことにより、検出可能な量の標的核酸ポリマーをえて、

(i) 段階(i)の前に標的核酸ポリマーを固体支持体に固定化すること、

(ii) 検出可能な量の標的核酸ポリマーを、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、該ポリマーに対してハイブリダイズされる時には、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に検出されるべき第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；

(c) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェントを用いてプライマーを延長すること；ならびに

(d) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出

物中、ポリメライジングエージェントを用いて第1の検出段階プライマーを延長すること；

(i) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって第1の定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか決定すること

(ii) 段階(c)において形成された延長された第1検出段階プライマーを標的核酸ポリマーから除去すること；ならびに

(iii) 第2の検出段階プライマーであって、固定化されたポリマーに対してハイブリダイズされる時には、第2の定められた部位と、プライマー3'末端との間に検出されるべき第3または第4のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーを加えること

を含んでなる、少なくとも第1のヌクレオチド残基が第1の定められた部位で第2のヌクレオチド残基によって置換されており、第3のヌクレオチドが第2の定められた部位で第4のヌクレオチド残基によって置換されている標的核酸ポリマー中の定められた部位での複数の特定のヌクレオチド変異を検出するための方法。

1. (i) 少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合した第1の付着部分を含有している標的増幅反応を行なうことにより、患者に由来する、検出可能な量の遺伝物質を含有するサンプルをえること；

(ii) 段階(i)の前に標的核酸ポリマーを固体支持体に固定化すること、

し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか決定すること

を含んでなる、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている標的核酸ポリマー中の定められた部位での特定のヌクレオチド変異を検出するための方法。

2. 少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合した第1の付着部分を含有している標的増幅反応を行なうことにより、検出可能な量の標的核酸ポリマーをえて、

(i) 段階(i)の前に標的核酸ポリマーを固体支持体に固定化すること、

(ii) 検出可能な量の標的核酸ポリマーを、一本鎖のかたちで、複数のヌクレオチド残基からなる第1の検出段階プライマーであって、該ポリマーに対してハイブリダイズされる時には、第1の定められた部位と、プライマーの3'末端との間に第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、第1の定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；

(c) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合

(c) その検出可能な量の遺伝物質を、一本鎖のかたちで第1のオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる第1の検出段階プライマーであって、該遺伝物質に対してハイブリダイズされる時には、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、第1の定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；

(d) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の錠終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェントを用いてプライマーを延長すること；ならびに

(i) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか、そして患者が関連遺伝病に対する素質を有するかどうか決定すること

という段階を含んでなる、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている患者の遺伝物質中の定められた部位での特定のヌクレオチド変異から結果として生じる患者の遺伝病素質を検出するための方法。

- (i) 少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合した第1の付着部分を含有している修飾反応を行なうことにより、微生物に由来する、検出可能な量の遺伝物質を含有するサンプルをえること；
- (ii) 段階(c)の前に標的核酸ポリマーを固体支持体に固定化すること、
- (c) 検出可能な量の遺伝物質を、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、該遺伝物質に対してハイブリダイズされるときには、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に検出されるべき第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、明確に定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
- (d) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含むしてなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の既終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1または第2のヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェンツを用いてプライマーを延長すること；
- (e) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか、そして点突然変異が起きているかどうか

は第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つのヌクレオシドトリホスフェートを含有している混合物中、ポリメライジングエージェンツを用いてプライマーを延長すること；ならびに

- (f) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか、そして突然変異細胞が存在するかどうか決定すること
- という段階を含んでなる、突然変異細胞が細胞集団中に混合されているとき、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている、遺伝物質中定められた部位での点突然変異を有する細胞を検出する方法。
9. プライマーが、定められた部位に直接に隣接するヌクレオチド残基から標的核酸ポリマーの3'末端方向に延長される、関心あるヌクレオチド配列の領域に相補的である請求項1から5記載の方法。
 10. 核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段を含有するヌクレオシドトリホスフェートがデオキシヌクレオシドトリホスフェートである請求項1から5記載の方法。
 11. 核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段を含有するヌクレオシドトリホスフェートがジデオキシヌクレオシドトリホスフェートである請求項1から5記載の方法。
 12. 混合物が、核酸ポリマーへの第2のヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための、第1の手段とは異なる第2の手段を含有する第2のヌクレオ

か決定すること

という段階を含んでなる、微生物の病原性または治療に対する耐性を変化させる微生物のゲノムにおける定められた部位での、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている点突然変異の存在を検出するための方法。

5. (i) 少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合した第1の付着部分を含有している修飾反応を行なうことにより、非突然変異細胞に対する突然変異細胞の比率を維持しながら、細胞手段から検出可能な量の遺伝物質をえること；
- (ii) 段階(c)の前に標的核酸ポリマーを固体支持体に固定化すること、
- (c) 検出可能な量の遺伝物質を、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、該遺伝物質に対してハイブリダイズされるときには、定められた部位と、プライマーの3'末端との間に検出されるべき第1または第2のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基がないように、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であるプライマーとハイブリダイズすること；
- (d) 1またはそれ以上のヌクレオシドトリホスフェートを含むしてなる混合物であって、核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出するための手段および任意に1またはそれ以上の既終りヌクレオシドトリホスフェートを含有してなる第1また

シドトリホスフェートを含む請求項1から5記載の方法。

10. 段階(d)の延長された生成物を取り込まれたヌクレオシドトリホスフェートの取り込みの決定の前に溶出させる請求項2記載の方法。
11. 複数の検出段階プライマーおよび変異ヌクレオチド残基を同定する異なった標識を行なったヌクレオシドトリホスフェートを加えることにより単一の段階でヌクレオチド変異を検出する請求項2記載の方法。
12. 微生物がHIVである請求項4記載の方法。
13. 点突然変異がAsp67、Lys10およびThr215の中からえらばれた部位にある請求項12記載の方法。
14. 細胞がリンパ球である請求項5記載の方法。
15. 細胞が白血病細胞である請求項14記載の方法。
16. (i) 標的核酸ポリマーの1部分に相補的でありハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、酵素核酸ポリメラーゼのためのプライマーおよび第1付着部分として有効である、オリゴヌクレオチドを含有する少なくとも1つの増幅プライマー；
- (ii) 標的核酸ポリマーの3'から変異ヌクレオチドまでの部分に相補的でありハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する少なくとも1つの検出段階プライマー；ならびに任意に
- (c) 固体マトリックス、および第1付着部分を介して増幅プローブのオリゴヌクレオチドを固定化することのできる少なくとも1つの付着部位を含有する少なくとも1つの固体支持体；および
- (d) 核酸ポリマーへのヌクレオシドトリホスフェート

の取り込みを検出するための手段を含有する少なくとも一つのヌクレオシドトリホスフェートのひとつと最初にされた組合せを含有してなる、標的核酸ポリマーにおける特定のヌクレオチド変異を決定するのに用いるためのキット。

17. 検出段階プライマーが

配列 5' - GCG CGG ACA TGG AGG ACG TG

を含んでなる、アポリポ蛋白 E 多型のヌクレオチド配列の同定において用いるための請求項 16 記載のキット。

18. 検出段階プライマーが

配列 5' -ATG CCG ATG ACC TGC AGA AG

を含んでなる、アポリポ蛋白 E 多型のヌクレオチド変異の同定において用いるための請求項 16 記載のキット。

19. 検出段階プライマーが

配列 5'-GTA CTG CAC CAG GCG GCC GC

を含んでなる、アポリポ蛋白E多型のヌクレオチド配列の同定において用いるための請求項16記載のキット。

20. 検出段階プライマーが

配列 5' -GGC CTG GTA CAC TGC CAG GC

を含んでなる、アポリポ蛋白E多型のヌクレオチド変異の同定において用いるための請求項16記載のキット。

21. 検出段階プライマーが

配列 5' - CAT GGT GCA CCT GAC TCC TG

を含んでなる、鎌状赤血球貧血を引き起こすヒトβ-

配列 5' - A C T G G T G G T G G T T G G A G C A G

を含んでなる、N-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

28. 検出段階プライマーが

配列 5' -ATC TGT TGA GGT GGG GAC TT

を含んでなる、HIV-1ウイルスにおけるAZTに対する耐性の検出において用いるための請求項16記載のキット。

2.9. 検出段階プライマーが

配列 5' - TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT

を含んでなる、囊胞性線維症の検出において用いるための請求項16記載のキット。

グロビン遺伝子のコドン6におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

2.2. 検出段階プライマーが

配列 5' - CAG TAA CCG CAG GCG GCC GC

を食んでなる、鎌状赤血球貧血を引き起こすヒトβ-グロビン遺伝子のコドン6におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

23. 検出段階プライマーが

配列 5' - AAG GCA CTC TTG CCT ACG CCA

を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

24. 検出段階プライマーが

配列 5' - AGG CAC TCT TGC CTA CGC CAC

を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

25. 検出段階プライマーが

配列 5' - AAC TTG TGG TAG TTG GAG CT

を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

26. 検出段階プライマーが

配列 5' - A C T T G T G G T A G T T G G A G C T G

を含んでなる、K-ras遺伝子のコドン12におけるヌクレオチド変異の検出において用いるための請求項16記載のキット。

27. 検出段階プライマーが

國際調查報告

[illegible]

国際調査報告

FI 9100046
SA 44729

International Application No. PCT/FI 91/00046

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Category of Document "C" can designate, where appropriate, of the relevant document	Reason for Claim "R"
Y	EP, A. 0170694 (CETUS CORP.) 30 May 1990 see the whole document	6-13,18
Y	EP, A. 0157011 (ABBOTT LABORATORIES) 7 March 1990 see the whole document	6-13,18
A	EP, A. 0132435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 13 September 1989 cited in the application	
A	WO, A. 90/11372 (COLLABORATIVE RESEARCH INC.) 4 October 1990	
A	EP, A. 0133465 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 20 September 1989	
A	WO, A. 89/09835 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 19 October 1989	
P,X	EP, A. 0171437 (ORION-YHTYMA OY) 6 June 1990 see the whole document	1
Y		5-13,18

Form PCT/ISA 210 (extra sheet) (January 1993)

The search has the patent found documents relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The documents are as contained in the European Patent Office EDP file on 1/18/91. The European Patent Office is at no time liable for those documents which are thereby given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A- 8910414	02-11-89	AU-A- 1694689	24-11-89
WO-A- 9009455	23-08-90	None	
US-A- 4851331	25-07-89	None	
EP-A- 0117074	24-05-89	AU-A- 2178188 JP-A- 1222800	13-04-89 06-09-89
EP-A- 0123513	31-10-84	CA-A- 1219793 DE-A- 3469366 JP-A- 5920845 US-A- 4656127	31-03-87 24-03-88 26-11-84 07-04-87
EP-A- 0170694	30-05-90	CA-A- 2002076 JP-A- 2299600	21-05-90 11-12-90
EP-A- 0157011	07-03-90	AU-A- 4028189 JP-A- 2174698	09-03-90 06-07-90
EP-A- 0132435	13-09-89	AU-A- 3124689 JP-A- 2042999	14-09-89 13-02-90
WO-A- 9011372	04-10-90	AU-A- 5158990 AU-A- 5640090 WO-A- 9012115	22-10-90 05-11-90 18-10-90
EP-A- 0133465	20-09-89	AU-A- 3141289 JP-A- 2031699	21-09-89 01-02-90
WO-A- 8909835	19-10-89	AU-A- 3539089	03-11-89
EP-A- 0171437	06-06-90	AU-A- 4574989 CA-A- 2004056 JP-A- 2219600	07-06-90 29-05-90 03-09-90

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/91

第1頁の続き

©Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/10
15/49
C 12 Q 1/70

8114-4B